

PAULO ROBERTO SARTURI

**VARIAÇÃO GENÉTICA NOS EXONS 2, 3 E 8 DE HLA-G E SUA RELAÇÃO COM O
ABORTAMENTO RECORRENTE**

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO EM GENÉTICA, DO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, DO SETOR DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ.**

**ORIENTADORA: PROFESSORA DOUTORA
 MARIA DA GRAÇA BICALHO**

CURITIBA

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**VARIAÇÃO GENÉTICA NOS EXONS 2, 3 E 8 DE HLA-G E SUA RELAÇÃO COM O
ABORTAMENTO RECORRENTE**

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO EM GENÉTICA, DO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, DO SETOR DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ.**

ALUNO: PAULO ROBERTO SARTURI

**ORIENTADORA: PROFESSORA DOUTORA
MARIA DA GRAÇA BICALHO**

CURITIBA

2005



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Programa de Pós-Graduação em Genética

P A R E C E R

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a que se submeteu **PAULO ROBERTO SARTURI**, para fins de adquirir o título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Curso de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 27 de maio de 2005.

Banca Examinadora:



M. Bicalho

Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho
Orientadora e Presidente

R. A. Moliterno

Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno
Membro

Valéria Sperandio Roxo

Profa. Dra. Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo
Membro

Visto:

G. Glienke

Profa. Dra. Chirlei Glienke de Blanco
Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

“Nunca andes pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde outros já foram”.

Alexander Graham Bell

À minha esposa, Juliane, pelo incansável apoio,
estímulo e total compreensão. Aos meus pais,
Violar e Adilse, pelo constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

Foi indispensável para a realização desse trabalho o inexaurível apoio dos amigos, professores e instituições, aos quais agradeço.

Meu agradecimento especial à Profa. Maria da Graça Bicalho, por sua constante disposição, empatia, orientação e conselhos.

Ao Sr. Sérgio Dantas Teixeira, pelo grande companheirismo demonstrado nesses dois anos em que dividi o meu tempo útil entre os trabalhos referentes ao mestrado e o meu emprego na Induslab.

Ao Prof. Iglénir J. Cavalli, que ao longo do tempo mostrou-se, além de um excelente professor, um grande amigo.

À Sônia, Fernanda, Paola, Savana, Alessandro, Eni, Fabiana, José, Téo, Isolde e Pablo, meus grandes companheiros do Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade – LIGH. Ao Valdir, pela inestimável contribuição através do Programa LIGH.

Aos meus grandes amigos e parceiros para todas as horas, Marcus Vinícius, Rafael e Márcio.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Molecular Humana, Karen, Daniele, Karin e Márcia, por sua amizade e auxílio na elaboração deste trabalho.

Às Professoras Maria Luiza Petzl-Erler e Valéria E. Roxo, pela incansável ajuda no delineamento desse trabalho e suas devidas correções.

À Profa. Roseli Wassem e ao Prof. Ricardo Lehtonen, pelas inestimáveis dicas e conselhos para a produção dessa pesquisa.

A todos os colegas, funcionários e professores do Departamento de Genética, pelo incondicional apoio durante a execução desse trabalho.

À minha esposa Juliane de Araujo, que se mostrou sempre parceira e me suportou nos momentos de extrema dificuldade que surgiram nesses dois anos. Obrigado pelo seu amor e dedicação, sem os quais seria impossível ter chegado até aqui.

Aos meus pais, Violar e Adilse Sarturi e minha irmã Priscila Sarturi, pela ajuda moral e financeira durante todo esse tempo.

Aos meus sogros, Iuda e Manoel de Araujo, às minhas cunhadas, Tânia, Márcia, Vânia, Eliane e Ione, ao meu “irmão mais velho” Frodoaldo e ao Alexandre, pelo carinho, pelo apoio, e por terem me deixado fazer parte da sua maravilhosa família.

A todas as demais pessoas que, de forma direta ou indireta, sempre contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Deus, por me permitir ter todas essas pessoas sempre ao meu lado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
RESUMO.....	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (CPH).....	03
2.2 O SISTEMA GÊNICO HLA	03
2.3 HISTÓRICO DO GENE HLA-G	05
2.4 O GENE HLA-G, A PROTEÍNA HLA-G, SUAS ISOFORMAS E FUNÇÕES	05
2.5 REGIÃO REGULADORA DE HLA-G	08
2.6 VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS E POLIMORFISMO DE HLA-G	10
3. OBJETIVOS	13
4. JUSTIFICATIVA	14
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	15
5.2 SEQUENCIAMENTO DOS EXONS 2 E 3 DO GENE HLA-G.....	16
5.2.1 Extração do ADN genômico.....	16
5.2.2 Cálculo da concentração do ADN.....	16
5.2.3 Amplificação dos exons 2 e 3.....	16
5.2.4 Purificação e sequenciamento das amostras.....	18

5.3 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO EXON 8 DE HLA-G.....	19
5.3.1 Extração do ADN genômico.....	19
5.3.2 Cálculo da concentração do ADN	19
5.3.3 Amplificação do exon 8 de HLA-G	20
5.3.4 Análise dos fragmentos de PCR	21
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ALELOS DE HLA-G (EXONS 2 e 3)	21
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
 6. RESULTADOS.....	24
6.1 RESULTADOS – NÍVEL ALÉLICO	24
6.2 RESULTADOS – NÍVEL GENOTÍPICO	26
6.3 RESULTADOS – NÍVEL PORTADORES	29
6.4 RESULTADOS – NÍVEL HAPLOTÍPICO	32
6.5 RESULTADOS – ALELOS AGRUPADOS	33
 7. DISCUSSÃO	39
 8. CONCLUSÃO.....	48
 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
 APÊNDICES	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	01 – MAPA GENÉTICO SIMPLIFICADO DO CPH COM ÊNFASE NO SISTEMA HLA (6p21.3).....	05
FIGURA	02 – ORGANIZAÇÃO DE EXONS E INTRONS DO GENE HLA-G, PROCESSAMENTO ALTERNATIVO E ISOFORMAS.....	08
FIGURA	03 - ESTRUTURA DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES CPH CLASSE Ib.....	09
FIGURA	04 – CORRIDA ELETROFORÉTICA - EXON 8 DE HLA-G	21
FIGURA	05 – ELETROFEROGRAMA HLA-G – EXON 2 (PARTE)	22
FIGURA	06 – ELETROFEROGRAMA HLA-G – EXON 3 (PARTE)	22

LISTA DE TABELAS

TABELA	01 - FREQUÊNCIA ALÉLICA (%) EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	12
TABELA	02 - NOMENCLATURA DE ALELOS HLA	12
TABELA	03 – CÓDONS DE ALELOS HLA-G	22
TABELA	04 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS – PACIENTES X CONTROLES	24
TABELA	05 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS – PACIENTES FEMININOS X CONTROLES FEMININOS.....	25
TABELA	06 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS – PACIENTES MASCULINOS X CONTROLES MASCULINOS	26
TABELA	07 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS – PACIENTES X CONTROLES	27
TABELA	08 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS – PACIENTES FEMININOS X CONTROLES FEMININOS	28
TABELA	09 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS – PACIENTES MASCULINOS X CONTROLES MASCULINOS	29
TABELA	10 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE PORTADORES – PACIENTES X CONTROLES	30
TABELA	11 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE PORTADORES – PACIENTES FEMININOS X CONTROLES FEMININOS	31
TABELA	12 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE PORTADORES – PACIENTES MASCULINOS X CONTROLES MASCULINOS	32
TABELA	13 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS – PACIENTES X CONTROLES.....	33
TABELA	14 – ALELOS AGRUPADOS – COMPARAÇÕES DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS	34
TABELA	15 – ALELOS AGRUPADOS – COMPARAÇÕES DE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS	36
TABELA	16 – ALELOS AGRUPADOS – COMPARAÇÕES DE FREQUÊNCIAS PORTADORES	37
TABELA	17 – ALELOS AGRUPADOS – COMPARAÇÕES DE FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico (DNA)
ARE	Abortamento Recorrente Espontâneo
ARN	Ácido Ribonucleico (RNA)
HLA	(Human Leukocyte Antigen) Antígenos Leucocitários Humanos
KIR	(Killing Inhibitory Receptor) Receptor Inibidor de Lise Celular
LTh1	(T Helper 1 Lymphocyte) Linfócito T Auxiliar 1
LTh2	(T Helper 2 Lymphocyte) Linfócito T Auxiliar 2
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	Natural Killer
PCR	(Polymerase Chain Reaction) Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-SSO	(Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide) Reação em Cadeia da Polimerase - Oligonucleotídeo Sequência Específica
Q.S.P.	Quantidade Suficiente Para
RSA	(Recurrent Spontaneous Abortion) Abortamento Recorrente Espontâneo
RFLP	(Restriction Fragment Length Polymorphism) Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição
sHLA-G	HLA-G solúvel
3'UTR	(Untranslated Region) Região 3' transcrita e não traduzida

RESUMO

A etiologia de uma fração dos casos de ARE (Abortamentos Recorrentes Espontâneos) parece estar relacionada a mecanismos imunogenéticos. Estudos das moléculas HLA clássicas de Classe I e II e sua relação com o ARE não têm sido conclusivos. Além disso, com exceção de HLA-C, os antígenos deste sistema não são expressos na interface materno-fetal. HLA-G é expresso especialmente nessa região e existe sob as formas de proteína solúvel ou de ligação à membrana, indicando um possível papel na modulação da imunotolerância materno-fetal. O presente trabalho analisou pela técnica de sequenciamento de ADN (exon 2 e 3) e por corrida de produtos de PCR em gel de agarose (exon 8) as amostras de 50 casais com dois ou mais ARE e amostras de 68 casais com pelo menos duas gestações a termo e sem complicações. O ARE é um fenômeno de causas multifatoriais bastante diversas e de difícil definição. Entretanto, o fator genético tem se mostrado bastante evidente em diversos estudos que apontam a influência de alelos e variantes do gene *HLA-G* no estabelecimento da imunotolerância materna ao aloenxerto (feto). No presente trabalho o alelo *HLA-G*010103*, o grupo *HLA-G*0101A* (*HLA-G*010101* e *HLA-G*010106*), o grupo de alelos com substituição nucleotídicas sinônimas, e a variante *14* (ausência da deleção de 14pb no exon 8 de *HLA-G*) têm mostrado exercer efeito protetor contra o ARE. Os alelos *HLA-G*010403* e *HLA-G*010401*, o grupo de alelos com substituições nucleotídicas não sinônimas e a variante *del* (deleção de 14pb no exon 8 de *HLA-G*) parecem conferir predisposição ao ARE.

1 INTRODUÇÃO

O gene *HLA-G* faz parte do sistema gênico HLA, situado no cromossomo 6 humano (Região 6p21.3), e é composto por oito exons e sete introns. O transcrito primário sofre processamento (splicing) alternativo, podendo dar origem a sete isoformas da proteína HLA-G, sendo que quatro dessas isoformas ligam-se à membrana celular e três apresentam-se sob a forma solúvel. *HLA-G* apresenta um polimorfismo discreto de poucos alelos (15), quando comparado às moléculas HLA clássicas.

Uma das propriedades do sistema imune adaptativo é a capacidade de discriminação entre antígenos próprios e não-próprios. No que se refere à histocompatibilidade, tornou-se evidente que moléculas HLA codificadas por genes localizados na região CPH do cromossomo 6 humano desempenham importante papel na rejeição imunológica, fato comumente observado nos transplantes clínicos. A rejeição é causada por resposta imune dirigida a aloantígenos presentes no enxerto, em especial proteínas ou antígenos HLA. De acordo com as “regras clássicas” de transplantes, a maior compatibilidade HLA entre doador e receptor aumenta as chances de aceitação do aloenxerto, diminuindo o risco de rejeição em consequência de uma resposta imune dirigida aos aloantígenos presentes no tecido ou órgão transplantado. Uma exceção a essas “regras” seria a gravidez, onde o embrião, apesar de expressar moléculas HLA derivadas do haplótipo paterno, não é rejeitado. Mesmo expressando proteínas HLA estranhas à mãe, um embrião haploidêntico é tolerado e a gestação, normalmente, é bem sucedida.

Acredita-se que a tolerância imunológica materno-fetal seja o resultado de interações específicas entre as células fetais e maternas. Geralmente, as células trofoblásticas fetais estão em contato direto com a circulação materna e, portanto, seriam alvo de um reconhecimento imunológico pelas células maternas competentes, devido à presença de moléculas HLA codificadas pelo haplótipo paterno. Entretanto, as células fetais do citotrofoblasto humano não expressam as moléculas de classe I clássicas (HLA-A e HLA-B) e de classe II, enquanto que as moléculas de HLA-G são as moléculas HLA predominantes nessas células trofoblásticas. Ao contrário das moléculas clássicas de Classe I que se

encontram presentes em todos os tipos celulares, a molécula HLA-G tem a sua expressão restrita às células da interface materno-fetal e a outros locais considerados imunologicamente privilegiados, o que sugere alta especialização e possível atuação em mecanismos de indução de tolerância.

Os resultados obtidos em estudos que investigam a participação das moléculas de HLA-G na gestação ainda são bastante contraditórios no que se refere à influência dos alelos de *HLA-G* na imunotolerância. Alguns estudos: PFEIFFER et al. (2001), OBER et al. (1998) indicam que alelos *HLA-G*0105N* e *HLA-G*010103* estariam associados a níveis significativamente baixos de HLA-G solúvel, o que sugere uma correlação positiva com abortamentos recorrentes espontâneos (definidos, segundo CHOUDHURY e KNAPP (2000), como 2 ou mais abortamentos de primeiro trimestre).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (CPH)

O primeiro sistema gênico caracterizado como Complexo Principal de Histocompatibilidade foi descrito em camundongos, e recebeu esta denominação por sua constatada influência nos transplantes de tecidos nesses animais. As primeiras moléculas foram descritas como antígenos polimórficos da superfície celular e eram codificadas por um *locus* gênico denominado H-2. Os produtos desse *locus* constituíam a principal barreira imunológica aos transplantes de aloenxertos. Esses antígenos foram denominados antígenos de histocompatibilidade e codificados por genes de mesmo nome. Posteriormente, complexos gênicos homólogos que codificavam produtos moleculares envolvidos na resposta imune foram descritos em várias espécies de mamíferos. DUNHAM et al. (1987).

2.2. O SISTEMA GÊNICO HLA

O Sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) foi descoberto na década de 50, por Dausset, Payne e van Rood, enquanto realizavam estudos sorológicos em pacientes politransfundidos, e detectaram anticorpos leucoaglutinantes. Dausset descreveu o primeiro antígeno ao qual denominou Mac (atual HLA-A2) (TERASAKI, 1960).

O sistema gênico HLA apresenta acentuado polimorfismo nas populações e está situado num segmento de aproximadamente 4Mb do braço curto do cromossomo 6 humano. Nessa região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), estão situados muitos genes que codificam para diferentes produtos moleculares, muitos deles com funções relacionadas à resposta imunológica. Os genes HLA codificam para proteínas também conhecidas como antígenos de histocompatibilidade, assim denominadas por suas propriedades imunogênicas, ou seja, capacidade de provocar uma resposta imune em indivíduos HLA incompatíveis (PARHAM, 2001).

Os produtos dos genes do CPH, de acordo com a estrutura e função, são

comumente referidos e classificados como:

a) Proteínas de Classe I – As moléculas de classe I, em humanos, são os antígenos clássicos de transplantes ou moléculas Classe Ia (HLA-A, B e C) e as moléculas não clássicas ou Classe Ib (HLA-E, HLA-F e HLA-G). Sendo *HLA-C*, *E* e *G* os únicos genes HLA expressos pelas células trofoblásticas na zona de contato entre a mãe e o feto, enquanto que os demais genes HLA Classe I são expressos pela maioria dos tipos celulares (LEWIN, 2001).

b) Proteínas de Classe II – HLA-DR, -DQ e -DP. Estão presentes na superfície dos linfócitos B e T e em outras células do sistema imune, como os macrófagos (LEWIN, 2001).

A função das proteínas HLA é apresentar peptídeos estranhos aos linfócitos T, participando da implementação da resposta imune. Particularmente, as proteínas HLA participam da ativação de linfócitos T (PARHAM, 2001).

A região de classe II humana está arranjada em quatro subregiões, DR, DQ, DZ/DO e DP. Nessa região também estão localizados os genes (TAP1, TAP2 e LMP2, entre outros) que codificam para produtos moleculares que não fazem parte do grupo de antígenos de histocompatibilidade (LEWIN, 2001).

Dentro da região CPH existe também a região de Classe III, que abriga genes atuantes no processo de ativação do sistema complemento (Bf, C2, C4A, C4B) e genes da 21-hidroxilase, da hemocromatose, TNF e LTA, que codificam as citocinas TNF- α e LT- β (antigo TNF- β) respectivamente, entre outros (LEWIN, 2001).

Os genes do sistema HLA estão arranjados da seguinte forma: na direção do telômero para o centrômero, os genes de classe I são seguidos pelos genes da região de classe III e, depois, pelos genes das sub-regiões de classe II, DR, DQ e DP (Figura 01).

Todas as proteínas codificadas pelos genes HLA são dímeros localizados na membrana plasmática, com uma parte da proteína projetando-se a partir da superfície extracelular. As proteínas de classe II consistem de duas cadeias, α e β , cuja combinação gera uma estrutura tridimensional com dois domínios extracelulares. As proteínas de classe I consistem em um dímero formado pela cadeia pesada, codificada pelos respectivos genes de Classe I e pela proteína β 2-microglobulina, codificada por um gene de mesmo nome situado

no cromossomo 15. Possuem três domínios externos, uma região transmembrana e um pequeno domínio citoplasmático que reside no interior da célula. (LEWIN, 2001).

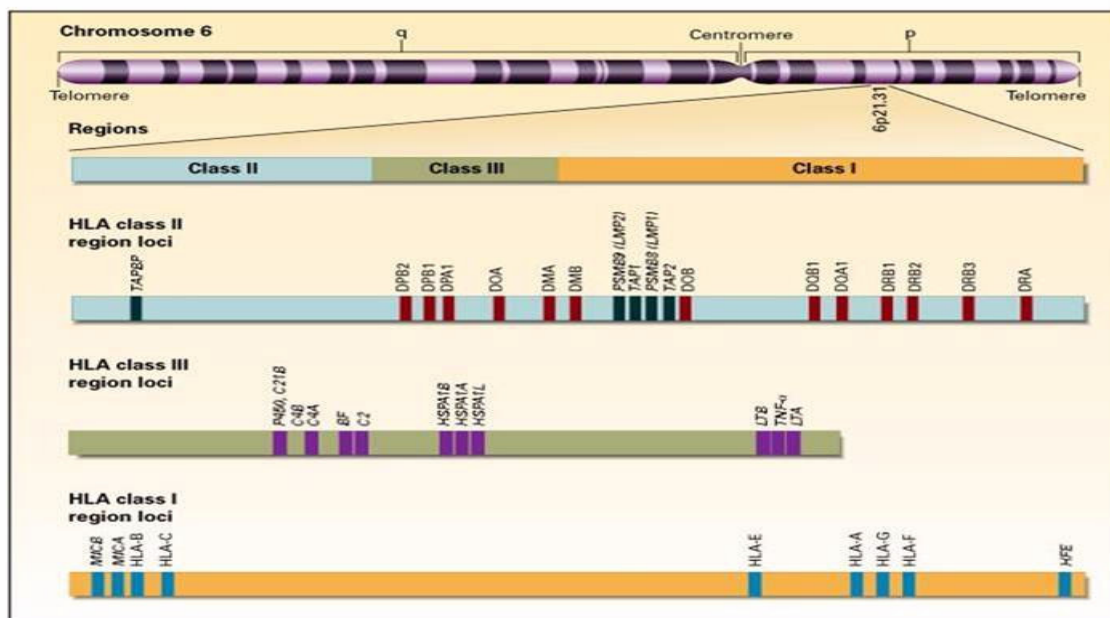


FIG. 01 – MAPA GENÉTICO SIMPLIFICADO DO CPH COM ÊNFASE NO SISTEMA HLA (6p21.3) (NEJM, 2004).

2.3. HISTÓRICO DO GENE *HLA-G*

O gene *HLA-G* foi primeiramente descrito por GERAGHTY et al. (1987), quando realizavam uma análise de ADN genômico. Esta análise revelou genes similares aos bem conhecidos genes do CPH de Classe Ia (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) (HUNT et al., 2000). ELLIS et al. (1986), já haviam observado uma molécula diferente de HLA de Classe I em seus estudos com células trofoblásticas que Geraghty descreveu e deu o nome de *HLA-6.0* (por estar localizado no interior de um fragmento de restrição gerado por Hind III, com 6.0 Kb). Somente em 1990 foi possível associar *HLA-6.0* como sendo *HLA-G*.

2.4. O GENE *HLA-G*, A PROTEÍNA HLA-G, SUAS ISOFORMAS E FUNÇÕES

HLA-G possui uma limitada distribuição tecidual, apresentando pronunciada expressão nas células trofoblásticas da placenta durante o primeiro trimestre de gravidez

(HVIID et al. 1997). São muitas as evidências que sugerem que a modulação da expressão das moléculas HLA-G poderia ser uma condição fundamental para uma gestação sem transtornos, o que estaria, em parte, associada à expressão em níveis elevados da molécula HLA-G solúvel (sHLA-G) (PFEIFFER et al. 2000; VINGANO et al. 2003). Segundo REBMANN et al. (1999), os alelos *HLA-G*010103* e *HLA-G*0105N* estariam associados a baixos níveis de expressão de sHLA-G. O nível de HLA-G solúvel parece modular o perfil materno de citocinas. Baixos níveis são freqüentemente encontrados em conjunto com o perfil Th1 de citocinas: IL-2, TNF- α e IFN- γ (perfil inflamatório), e altos níveis parecem estar associados ao perfil Th2 de citocinas: IL-4, IL-5 e IL-10 (perfil inibidor de inflamação). As moléculas de HLA-G solúvel também poderiam ter uma função na regulação da angiogênese placentária ou poderiam agir como imunossuppressores durante a gestação (LE BOUTEILLER; LEGRAND-ABRAVANEL; SOLIER, 2003).

Contrastando com a expressão acentuada do HLA-G neste tecido, existe uma ausência quase total da expressão das moléculas Classe Ia (HLA-A e HLA-B) e classe II; este fato apresenta-se como aparentemente importante no mecanismo de tolerância imunológica materno-fetal (LE BOUTEILLER; LEGRAND-ABRAVANEL; SOLIER, 2003; VAN DER VEN et al., 2000; GOBIN et al. 1999).

O gene *HLA-G* é composto por oito exons, sete introns e uma região 3' transcrita e não traduzida (3'UTR) que faz parte do exon 8. O exon 6 apresenta um códon de terminação que leva à produção de uma proteína truncada com a perda de 19 resíduos de aminoácidos que nas moléculas HLA clássicas são altamente conservados. A molécula HLA-G exibe um alto grau de similaridade com a molécula funcional HLA-A2 (todas as posições relevantes para interação com β_2 -microglobulina - uma condição básica para a manutenção da conformação nativa das moléculas HLA classe I, são conservadas na sequência *HLA-G* selvagem) (VAN DER VEN et al., 2000).

Uma das características dos transcritos primários de *HLA-G* é o processamento alternativo, responsável pela produção de sete isoformas de proteínas distintas. Quatro destas são ligadas à membranas (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 e HLA-G4) e outras três isoformas são proteínas solúveis (HLA-G5, HLA-G6 e HLA-G7; Figura 02) (CAROSELLA et al., 2001;

BAINBRIDGE et al., 2001; LILA et al., 2002). Também foi observado que diferentes alelos *HLA-G*, embora não divergentes na composição de aminoácidos de suas regiões de ligação a antígenos, podem ser correlacionados com diferentes níveis de *HLA-G1* solúvel no plasma (VAN DER VEN et al., 2000).

As formas solúveis *HLA-G5* e *HLA-G6* são devidas à tradução do intron 4, o qual contém um códon de parada, evitando a tradução das seqüências transmembrana e citoplasmática. Já a isoforma solúvel *HLA-G7* é decorrente da retenção do intron 2 ao RNAm, produzindo uma molécula com 117 aminoácidos que contém apenas o domínio $\alpha 1$ da molécula ligado a 2 aminoácidos no terminal carboxila codificado pelo intron 2 (PAUL et al. 2000). Postula-se que as formas solúveis de *HLA-G* possuam uma ação, local ou sistêmica, de regulação da produção de citocinas por meio da interação com células T $CD4^+$ ou por alterações nos grupos de leucócitos presentes no útero (indução de apoptose em células T $CD8^+$), (LE BOUTEILLER et al. 2003; HUNT et al. 2000).

ROUAS-FREISS et al. (1999) demonstraram, usando tecidos fetais e maternos frescos obtidos durante o primeiro trimestre de gravidez, o provável papel das moléculas *HLA-G* na proteção do feto contra a atividade lítica das células NK maternas do útero. Foram testadas seis combinações semi-alogênicas (células NK uterinas maternas e suas próprias contra-partes trofoblásticas) e 20 combinações alogênicas (células NK uterinas maternas e trofoblastos de diferentes origens maternas). Em todas as combinações, observou-se pronunciado efeito protetor da molécula *HLA-G*. Foi observado, também, que o tratamento dos trofoblastos com anticorpos monoclonais (W6/32), os quais se ligam e inativam as moléculas de *HLA-G* e *HLA C*, removem o efeito protetor de lise por células NK. A hipótese do efeito protetor das células do feto contra a lise mediada por células NK maternas é apoiada no trabalho de VAN DER VEN et al. (2000).

As células NK são componentes da resposta imune inata (mas estão em constante interação com a resposta imune adaptativa) e têm sua ação regulada através da interação com citocinas e outros fatores. São conhecidas pela sua habilidade em lisar células-alvo que estejam apresentando antígenos reconhecidos como não-próprios ou que não possuam, em sua superfície, moléculas *HLA* próprias. As moléculas *HLA-G* parecem interagir com receptores

inibitórios (KIR) de células NK, protegendo as células trofoblásticas (interface materno-fetal) contra a lise mediada por células NK que ocorreria devido à quase ausência da expressão de moléculas CPH de Classe I nessas células (EMMER et al., 1999; PAZMANY et al., 1999; ROUSSEAU et al, 2000).

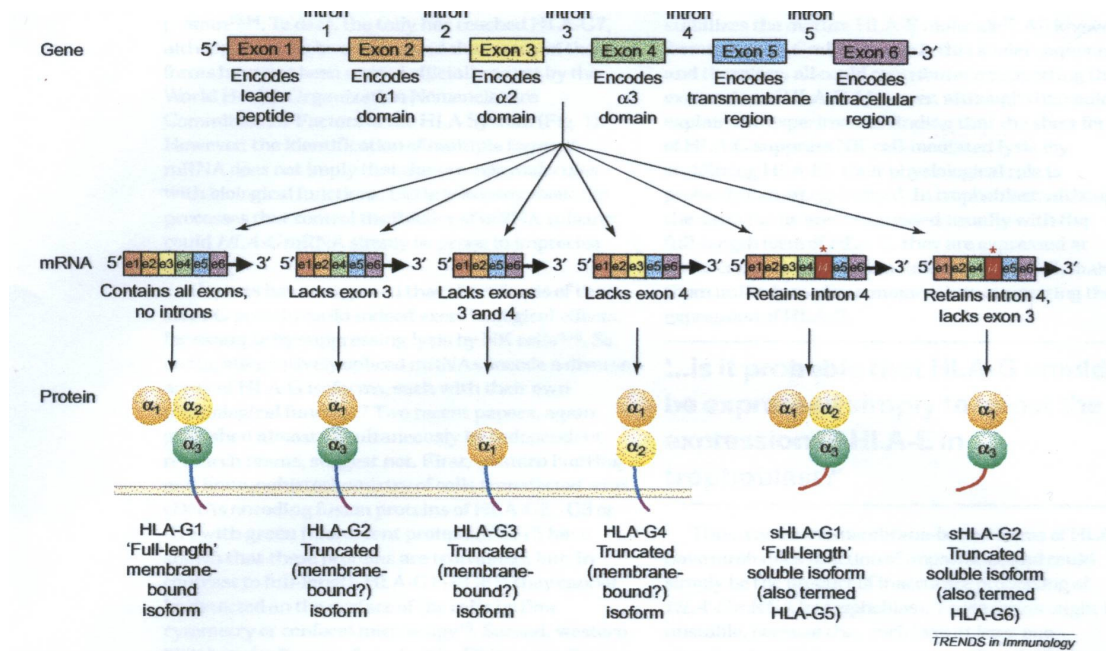


FIG. 02 – ORGANIZAÇÃO DE EXONS E INTRONS DO GENE *HLA-G*, PROCESSAMENTO ALTERNATIVO E ISOFORMAS, HLA-G7 NÃO MOSTRADA. (BAINBRIDGE, 2001).

2.5 REGIÃO REGULADORA DE *HLA-G*

O controle da transcrição do *HLA-G* ocorre via elementos reguladores de ação cis: intensificador A, ISRE (Sequência Consenso de Interferon) e o módulo SXY. O intensificador A, o ISRE e o módulo SXY localizam-se na região promotora do gene e formam um módulo de indução com sítios ligantes para membros das famílias NF- κ B p50, p65 e c-Rel, IRF-1 e IRF2, ISF1 e ISF2, e Sp1 (fator transcricional das rotas de transativação constitutiva induzida por citocinas). O módulo SXY (figura 03) é composto por sequências S, X (compreendendo os meio-sítios X_1 e X_2) e Y ligadas cooperativamente por complexos de multiproteínas (RFX, CREB/ATF e NFY). Em *HLA-G*, este módulo SXY possui sequências S e X_1 homólogas aos de classe I, mas sequências Y e X_2 divergentes. Como este segundo

bloco é muito importante para formação ordenada do complexo no módulo SXY e para a transativação induzida por CIITA (Transativador de Classe II), o *HLA-G* não é induzido por CIITA nem RFX5. Além desses 3 elementos regulatórios, há um outro elemento regulatório de 250pb que controla a transcrição de *HLA-G* a 1Kb a montante do exon 1 (CAROSELLA; DAUSSET e KIRSZENBAUM, 1996; GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000; ROUSSEAU et al., 2004).

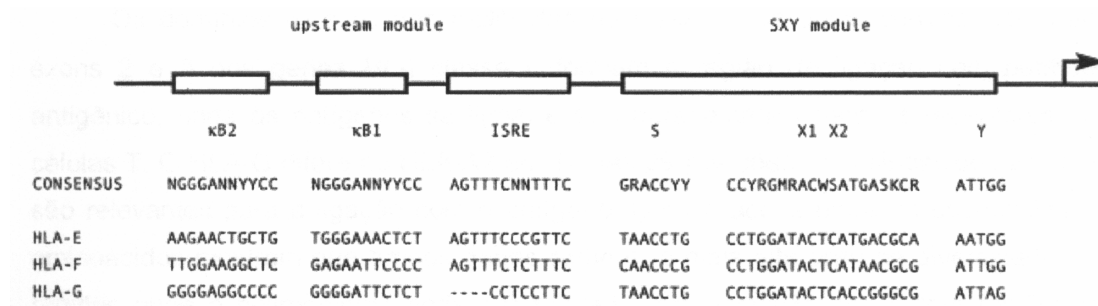


FIGURA 3 – ESTRUTURA DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES CPH CLASSE Ib (GOBIN; VAN DEN ELSEN, 2000)

Em *HLA-G*, os dois sítios kB do intensificador A (κB1 e κB2) apresentam afinidade somente para a subunidade p50 do NF-kB (fator transcricional kB), o que não é suficiente para ativar a transcrição, visto que não há ligação em níveis significantes com outras porções de NF-kB que possuam propriedades transativadoras. Em adição, o sítio κB2 do *HLA-G* também se liga ao Sp1 (fator transcricional mediador das rotas de transativação constitutivas e induzidas por citocinas). A região de supressão do intensificador A, a qual tipicamente contém o ISRE em promotores de CPH de Classe I, aparentemente está parcialmente ausente em *HLA-G*. Esta região (a porção 3' do sítio κB1 e as seqüências supressoras) não apresenta qualquer afinidade de ligação com proteínas da família de fatores transcacionais IRF (Fator Regulatório de Interferon), mas contém um outro sítio de ligação com Sp1. Entretanto, este elemento não pode mediar a expressão de *HLA-G* induzida por IFN-gama. Nenhum outro sítio de ligação para o IRF ou STAT1 (Tradutor de Sinal e

Ativador de Transcrição) foi identificado nesta região promotora de 220pb, o que demonstra a não-responsividade do *HLA-G* ao IFN-gama (GOBIN e VAN DEN ELSEN, 2000).

Análises de seqüências têm revelado a presença de outra região regulatória potencial a 1438pb na região promotora do gene *HLA-G*, assim como sítios de ligação para as proteínas AP1, STAT1, IFR1e NF-kB. Entretanto, esta região foi incapaz de induzir a transativação de *HLA-G*.

2.6 VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS E POLIMORFISMO DE *HLA-G*

Dentre as variações nucleotídicas ou mutações que caracterizam os 15 alelos de *HLA-G* (*G*010101*, *G*010102*, *G*010103*, *G*010104*, *G*010105*, *G*010106*, *G*010107*, *G*010108*, *G*0102*, *G*0103*, *G*010401*, *G*010402*, *G*010403*, *G*0105N* e *G*0106*) apenas três são não sinônimas (sendo uma delas uma mudança de matriz de leitura). A primeira substituição nucleotídica localiza-se no códon 31, que participa da codificação do domínio- α_1 , as outras duas substituições nucleotídicas, nos códons 110 e 130, estão relacionadas ao domínio- α_2 . As mutações do códon 31 (thr \rightarrow ser) e a do códon 110 (leu \rightarrow ile), levam a substituições de aminoácidos por outros de polaridade semelhante. O terceiro polimorfismo é uma mudança de matriz de leitura (frameshift mutation) devido à deleção de uma base no códon 130, exon 3, (*1597delC*). A presença desta mutação leva à instabilidade da proteína variante HLA-G1, devido à perda de uma ponte dissulfeto entre os resíduos 101 e 164, a qual estabilizaria a molécula HLA-G normal. Entretanto, proteínas variantes de HLA-G, as quais normalmente não possuem o domínio- α_2 (codificado pelo exon 3) defeitivo, por exemplo, a proteína G2, provavelmente são expressas normalmente, mesmo em indivíduos homozigotos para esta mutação.

A mutação *1597delC* foi a primeira mutação nula descoberta para o *HLA-G* que ocorre independentemente em diferentes grupos étnicos e em associação com dois polimorfismos silenciosos, no códon 57 (exon 2) e no códon 93 (exon 3). O alelo *G*0105N*, que possui a mutação *1597delC*, é fortemente associado ao *HLA-A30* (VAN DER VEN et al.

2000).

Com base nos polimorfismos dos códons 31 e 110 e na mutação de matriz de leitura do códon 130, foram definidos os alelos HLA (*G*0103*, *G*010401*, *G*010402*, *G*010403* e *G*0105N*) (ver Tabela 03). As frequências dos alelos de *HLA-G* são bastante variáveis entre grupos étnicos; por exemplo, o alelo *G*0105N* é relativamente freqüente entre negros-americanos (7,4%), mas pouco freqüente entre centro-europeus (2,3%) (VAN DER VEN et al. 2000). Dessa forma, a variabilidade alélica de *HLA-G* é bastante restrita se comparada àquela dos genes HLA clássicos.

As variações nas seqüências nucleotídicas dos exon 2 e exon 3 do gene *HLA-G* provavelmente originam proteínas HLA-G com diferentes atividades funcionais ou processamento alternativo do transcrito primário de *HLA-G*, gerando diferentes isoformas, que poderiam estar relacionadas a complicações durante a gravidez, tais como abortamentos espontâneos recorrentes (PÉNZES et al. 1999).

A presença de uma deleção (14pb) na região 3' UTR (exon 8) do gene *HLA-G* parece exercer influência na estabilidade do ARNm de *HLA-G*. Segundo ROUSSEAU et al., (2004), a deleção e a seqüência de 14pb estão presentes em aproximadamente 58% e 42%, respectivamente, da população caucasiana. Segundo os mesmos autores, tal polimorfismo poderia ter conseqüências funcionais, estando associado a baixos níveis de transcrito de *HLA-G*. O grupo de ROUSSEAU observou que alelos *HLA-G* que apresentavam a seqüência de 14pb (exon 8) sofriam um processamento alternativo (splicing) que removia 92pb da região 3'UTR, o que tornava a molécula mais estável e, portanto, mais resistente à degradação. Aparentemente, a seqüência de 14pb seria reconhecida pelo mecanismo de processamento como um ponto de clivagem. Em outra possibilidade, a seqüência de 14pb seria um elemento de controle acentuador de processamento (splicing), no qual a ligação de um transativador produziria um padrão diferenciado de processamento. Portanto, patologias como o abortamento recorrente espontâneo poderiam estar associadas à deleção de 14pb na região 3'UTR do exon 8 presente em alguns alelos.

Na tabela 01 são apresentadas as frequências alélicas de *HLA-G* em diferentes populações e na tabela 02 as regras utilizadas para a nomenclatura desses alelos.

TABELA 1 – FREQUÊNCIA ALÉLICA (%) EM DIFERENTES POPULAÇÕES

ALELO	Japonesa	Huterites	Finlandesa	Dinamarquesa	Alemã	Portuguesa	Espanhola	Afro-Americanos	Afro-Shona
G*010101	43	46	58	62	32	37	38	70	39,3
G*010102	14	21	38	27	36	31	22	6	14,4
G*010103	5	2	5	5	7	17	7	2,4	0
G*010104	ND	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
G*010108	ND	ND	ND	ND	9,1	ND	ND	ND	14,4
G*0103	ND	4	ND	ND	2,3	2	0	ND	0
G*010401	38	20	ND	5	6	13	11	13	20,4
G*010403	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,4
G*0105N	0	ND	ND	0,6	2,3	0	3	8,3	11,1
(n)	82	160	194	144	344	117	228	84	216

MATTE et al., 2000.

TABELA 2 – NOMENCLATURA DE ALELOS HLA

NOMENCLATURA	SIGNIFICADO
HLA	Região e prefixo para um gene HLA
HLA-G	Um locus HLA em particular, ex. G
HLA-G*01	Um grupo de alelos que codificam para o antígeno 01
HLA-G*0101	Um alelo HLA específico
HLA-G*0105N	Um alelo nulo
HLA-G*010101	Um alelo que difere dos demais por uma mutação sinônima
HLA-G*01010101	Um alelo que contém uma mutação fora da região codificadora
HLA-G*01010101N	Um alelo nulo que contém uma mutação fora da região codificadora

NOLAN, A., 2004

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral analisar a variabilidade genética dos exons 2, 3 e 8 do gene HLA-G nas amostras de casais-controle e casais com abortamento recorrente espontâneo. Os objetivos específicos são:

- comparar as frequências alélicas observadas no grupo paciente com as observadas no grupo controle.
- comparar as frequências genótípicas observadas no grupo paciente com as observadas no grupo controle.
- comparar as frequências de portadores de cada alelo ou variante de *HLA-G* observadas no grupo paciente com as observadas no grupo controle.
- comparar as frequências haplotípicas observadas no grupo paciente com as observadas no grupo controle. Sendo o haplótipo definido pelo alelo tipado (exons 2 e 3) juntamente com sua variante *del* ou *14* (exon 8).
- comparar as frequências alélicas, genótípicas, de portadores e haplotípicas dos grupos controle e paciente, reunindo os alelos em dois grandes grupos (alelos com substituições nucleotídicas sinônimas e alelos com substituições nucleotídicas não sinônimas).

4. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho se justifica pelo fato de não existir, ainda, um consenso a respeito dos fatores genéticos que atuam no complexo fenômeno do Abortamento Recorrente Espontâneo (ARE), o que evidencia a necessidade de um maior número de estudos que ajudem a elucidar a questão. O presente estudo é um dos primeiros a se realizar no Brasil, analisando casais com ARE e casais-controle pela técnica de sequenciamento de ADN.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foi realizado um estudo caso-controle composto por uma amostra paciente de 50 casais, nos quais as mulheres apresentam abortamento recorrente espontâneo (dois ou mais abortamentos de primeiro trimestre) de causa desconhecida. A amostra paciente é constituída por casais de grupo étnico caucasóide, sem parentesco entre eles e de nível sócio-econômico semelhante. As mulheres não apresentam registros de infecções, autoimunidade, nem alterações hormonais, ginecológicas, anatômicas ou cromossômicas. As amostras foram registradas pela Unidade de Genética Médica e Reprodução Humana do Hospital de Clínicas da UFPR, em Curitiba.

A amostra controle foi constituída por 68 casais não relacionados onde o marido e a mulher não apresentam qualquer parentesco entre si. As mulheres possuíam, ao menos, duas gestações a termo sem complicações, mostrando-se saudáveis e sem registros de abortamentos. Estas amostras foram pareadas atendendo a critérios de mesmo grupo étnico, etário e sócio-econômico da amostra paciente.

Na amostra paciente a idade média materna do primeiro aborto foi de 24,6 anos, sendo a idade média materna de todos os abortos de 26,4 anos. Com relação ao número de abortos, a amostra apresenta uma média de 2,87 (mínimo = 2 e máximo = 7). Na amostra controle, a idade materna de nascimento do primeiro filho foi de 22,9 anos e a idade média materna de nascimento de todos os filhos foi de 25,7 anos. O número médio de filhos da amostra foi de 2,6 (mínimo = 2 e máximo = 5).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas, sendo que os grupos paciente e controle assinaram um termo de consentimento para participação do estudo e para a coleta de amostras sanguíneas (ver apêndices: Termo de Consentimento e Fichas de Averiguação). A realização da pesquisa e demais análises foram conduzidas no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná.

5.2 SEQUENCIAMENTO DOS EXONS 2 E 3 DO GENE *HLA-G*

5.2.1 Extração do ADN Genômico

O ADN genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico pelo método *salting out* (JOHN et al. 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER Jr. 1991), o qual se desenvolve essencialmente em quatro etapas:

- a) Obtenção da camada de leucócitos por centrifugação do sangue total coletado com anticoagulante EDTA;
- b) Lise de eritrócitos através dos detergentes IGEPAL CA630 (SIGMA), SDS 10% e soluções hipotônicas TKM1 e TKM2;
- c) Precipitação de proteínas com NaCl 6M;
- d) Precipitação de ADN genômico com etanol absoluto.

5.2.2 Cálculo da Concentração do ADN

O ADN genômico extraído foi quantificado através da comparação com padrões de ADN (Low Mass Ladder DNA - Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose 2,5% (90V/40 minutos). A diluição para uso foi feita com água ultrapura até a obtenção da concentração de 20ug/ul.

5.2.3 Amplificação dos exons 2 e 3

Após a diluição das amostras, realizou-se a amplificação dos exons 2 e 3 pela metodologia de PCR, usando dois oligonucleotídeos iniciadores para a posição 5' (G25S e G35S) e dois para a posição 3' (G23S e G33S), conforme especificados a seguir:

G25S´	TCCATGAGGTATTTTCAGCGC
G23S´	AGGTAATCCTTGCCATCGTA

G35S' CCCAGACCCTCTACCTGGGAGA
 G33S' CTCTCCTTGTGCTAGGCCAGGCTG

A PCR foi realizada de acordo com as seguintes condições:

ADN Molde	0,3µg
Tampão Taq 10X	1X
dNTPs	0,25mM
Oligonucleotídeos Iniciadores	20pmoles/Cada
MgCl ₂	2mM
Taq Platinum Invitrogen	1U
Agua Ultrapura	q.s.p. 50µl

Ciclagem: temperatura/tempo (exon 2)

Desnaturação Inicial	96°C – 3´
1 – Denaturação	96°C – 1´
2 – Anelamento	64°C – 1´
3 – Alongamento	72°C – 1´
Alongamento Final	72°C – 10´
Número de Ciclos (passos 1, 2 e 3)	35 ciclos
(Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (P.E.))	

Ciclagem: temperatura/tempo (exon 3)

Desnaturação Inicial	94°C – 3´
1 – Denaturação	94°C – 1´
2 – Anelamento	72°C – 1´
3 – Alongamento	72°C – 1´
Alongamento Final	72°C – 10´
Número de Ciclos (passos 1, 2 e 3)	35 ciclos

(Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (P.E.)

5.2.4 Purificação e Sequenciamento das Amostras Amplificadas

Após a amplificação, o produto da PCR (50µl) foi purificado com acetato de amônia 7,5M, conforme protocolo abaixo, para isolar os fragmentos de PCR (exon 2 ou exon 3).

- a) Adicionar 27µl de acetato de amônia 7,5M e 167µl de etanol absoluto a 50µl de produtos de PCR, homogeneizar e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente;
- b) Centrifugar por 15 minutos a 14.000 RPM, descartar o sobrenadante e lavar com etanol 70%, homogeneizar e centrifugar por 15 minutos a 14.000 RPM;
- c) Descartar o sobrenadante e secar por 12 horas à temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento (cada exon em um tubo separado) com o Kit BigDye 3.1 Terminator (Applied Biosystems) conforme protocolo abaixo:

Master Mix – Amostra/Reação

Terminator Ready Mix	1,6µl
Fragmentos de PCR	6ng
Primer Sequenciamento	30pmol
Água Ultrapura	q.s.p. 20µl

Master Mix – Controle/Reação

Terminator Ready Mix	2µl
p-Gen (Plasmídeo Controle)	1µl
Primer (Kit)	4µl
Água Ultrapura	3µl

Ciclagem: Temperatura/Tempo

Desnaturação Inicial	96°C – 1´
1 – Denaturação	96°C – 10´´
2 – Anelamento	50°C – 5´´
3 – Alongamento	60°C – 4´
(Número de Ciclos – Passos 1, 2 e 3)	30 Ciclos

Posteriormente, as amostras foram purificadas novamente com acetato de amônia 7,5M e etanol para retirada dos primers, terminadores fluorescentes e outras impurezas, e obtenção de fragmentos de diversos tamanhos, marcados com os terminadores fluorescentes.

O produto purificado foi analisado em seqüenciador automático ABI-310 Applied Biosystems e os dados coletados pelos softwares ABI-310 Collection e Factura. Em seguida, os dados de seqüenciamento obtidos para os exons 2 e 3 foram visualizados com a ajuda do software gratuito BIOEDIT (HALL, 1999) e analisados estatisticamente.

5.3 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO EXON 8 DE HLA-G

5.3.1 Extração do ADN Genômico

O ADN genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico pelo método *salting out* (JOHN et al. 1990, modificado por LAHIRI e NURNBERGER Jr. 1991).

5.3.2 Cálculo da Concentração do ADN

O ADN genômico extraído foi quantificado através da comparação com padrões de ADN (Low Mass Ladder DNA - Invitrogen) em eletroforese em gel de agarose 2,5% (90V/40 minutos). A diluição para uso foi feita com água ultrapura até a obtenção da concentração de 20ug/ul.

5.3.3 Amplificação do exon 8

Após a diluição das amostras, realizou-se a amplificação do exon 8 pela metodologia de PCR, usando dois oligonucleotídeos iniciadores, um para a posição 5' (G85S) e outro para a posição 3' (G83S), conforme especificado a seguir:

G85S' GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTACC
 G83S' GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA

A PCR foi realizada seguindo as seguintes condições:

ADN Molde	0,3µg
Tampão Taq 10X	1X
dNTPs	0,25mM
Oligonucleotídeos Iniciadores	20pmoles/Cada
MgCl ₂	2mM
Taq Platinum Invitrogen	1U
Agua Ultrapura	q.s.p. 50µl

Ciclagem: temperatura/tempo (exon 8)

Desnaturação Inicial	94°C – 3´
1 – Denaturação	94°C – 30´´
2 – Anelamento	64°C – 1´
3 – Alongamento	72°C – 2´
Alongamento Final	72°C – 10´
Número de Ciclos (passos 1, 2 e 3)	35 ciclos
(Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (P.E.))	

5.3.4 Análise dos Fragmentos de PCR

Os fragmentos de PCR obtidos para o exon 8 foram analisados por meio de corrida em gel de agarose (Invitrogen, 2,5%) por 90V/1h e corados com brometo de etídio. Foram obtidos fragmentos com 210 e 224pb (amostra com deleção e amostra com ausência de deleção, respectivamente), como mostrado na Figura 04.

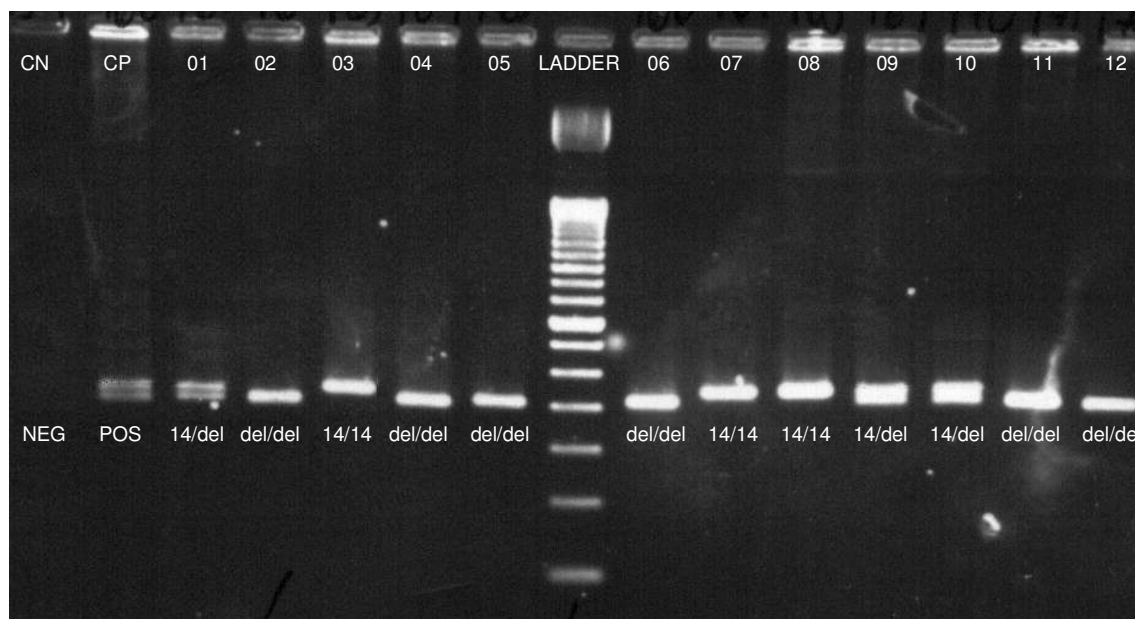


FIG. 04 – CORRIDA ELETROFORÉTICA - EXON 8 DE *HLA-G*

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ALELOS DE *HLA-G* (EXONS 2 e 3)

As seqüências de *HLA-G* para os exons 2 e 3 (ver exemplos nas figuras 05 e 06) foram analisadas e posteriormente tiveram suas seqüências para os códons 31, 54, 57 e 69 (no exon 2) e 93, 107, 110 e 131 (no exon 3) anotadas em uma tabela para posterior comparação com as seqüências conhecidas (Tabela 03) para os alelos de *HLA-G*.

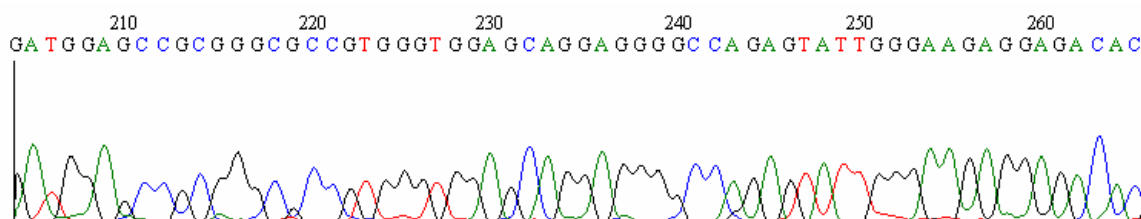


FIG. 05 – ELETROFEROGRAMA HLA-G, EXON 2 (PARTE)

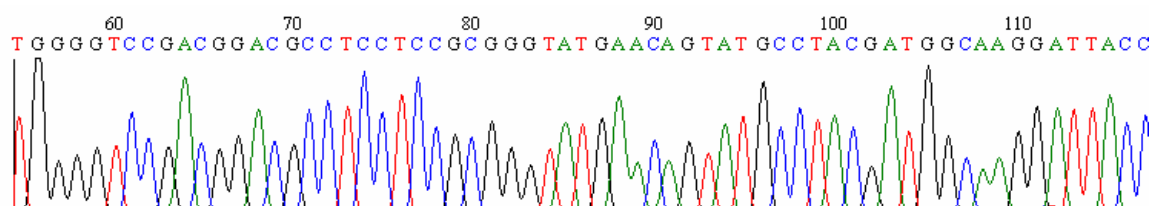


FIG. 06 – ELETROFEROGRAMA HLA-G, EXON 3 (PARTE)

TABELA 03 – CÓDONS DE ALELOS HLA-G

ALELOS	CODON 31	CODON 54	CODON 57	CODON 69	CODON 93	CODON 107	CODON 110	CODON 130
	ACG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGA	CTC	CTG
G*010101	ACG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGA	CTC	CTG
G*010102	ACG	CAG	CCA	GCC	CAT	GGA	CTC	CTG
G*010103	ACG	CAG	CCA	GCC	CAC	GGT	CTC	CTG
G*010104	ACG	CAG	CCG	GCT	CAC	GGA	CTC	CTG
G*010105	ACG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGT	CTC	CTG
G*010106	ACG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGA	CTC	CTG
G*010107	ACG	CAG	CCA	GCC	CAT	GGT	CTC	CTG
G*010108	ACG	CAG	CCA	GCC	CAC	GGA	CTC	CTG
G*0102	ACG	CGG	CCG	GCC	CAC	GGA	CTC	CTG
G*0103	TCG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGA	CTC	CTG
G*010401	ACG	CAG	CCA	GCC	CAC	GGA	ATC	CTG
G*010402	ACG	CAG	CCC	GCC	CAC	GGA	ATC	CTG
G*010403	ACG	CAG	CCG	GCC	CAC	GGA	ATC	CTG
G*0105N	ACG	CAG	CCA	GCC	CAT	GGA	CTC	-TG
G*0106	ACG	CAG	CCA	GCC	CAT	GGA	CTC	CTG

Com base na tabela acima, os 15 alelos de *HLA-G* foram combinados 2 a 2, originando 105 diferentes combinações que foram comparadas manualmente com as seqüências dos códons obtidos das amostras controle e paciente. Posteriormente, o resultado foi conferido com a ajuda do programa computacional de identificação de alelos de *HLA-G*, LIGH (Desenvolvido especialmente para esta pesquisa, disponível em: <http://200.17.239.199/waldir/pesquisa/index.php>). Deste modo, foi possível identificar os dois alelos presentes em cada indivíduo. Entretanto, os alelos *HLA-G*010101* e *HLA-G*010106*

foram agrupados como *HLA-G*0101A* (os dois alelos são idênticos para os exons 2 e 3, diferenciando-se no exon 4, que não foi analisado). Da mesma forma os alelos *HLA-G*010102* e *HLA-G*0106* também foram agrupados como *HLA-G*01B*, pelo mesmo motivo.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências genotípicas foram obtidas por contagem direta e comparadas com as frequências esperadas (segundo o Teorema de Hardy-Weinberg) com o auxílio do programa ARLEQUIN 1.1 (SCHNEIDER e cols., 1997), que utiliza o método de Guo e Thompson (1992). As frequências alélicas foram obtidas através da fórmula:

$$fal = n / 2N$$

Sendo *fal* a frequência relativa e *n* a frequência absoluta do alelo.

As frequências de portadores de cada alelo ou variante foram obtidas pelo método de contagem direta e as haplotípicas foram calculadas com o auxílio do programa ARLEQUIN 1.1 (Bootstraps = 10.000). Portador foi definido, no contexto deste trabalho, como o indivíduo que apresenta um dado alelo ou variante, independente da condição homozigota ou heterozigota. Haplótipo foi definido como a combinação calculada entre o alelo tipado (exons 2 e 3) e a sua variante *14* ou *del* (exon8).

As frequências alélicas, genotípicas, haplotípicas e de portadores foram comparadas (dentro de cada grupo) pelo método de χ^2 com o uso do programa RxC de análise de tabelas de contingência (citado em GUO E THOMPSON, 1992).

Para as comparações que mostraram significância ($P < 0,05$), calculou-se o Odds Ratio (OR) com Intervalo de Confiança de 95% com auxílio do método de Woolf, (1955). Quando um dos dados da tabela apresentou o valor zero utilizou-se a Correção de Haldane, que consiste de acrescentar o valor de 0,5 a todas as células da tabela de contingência com o objetivo de prevenir erro de cálculo do OR quando da divisão de um valor por zero.

Foram consideradas significativas as associações com $P \leq 0,05$ e como próximas ao limiar de significância (tendência) os valores de $P > 0,05$ e $\leq 0,10$.

6. RESULTADOS

Foram analisados, conforme descrito em Materiais e Métodos, 50 casais-pacientes e 44 casais-controle para os exons 2 e 3 de *HLA-G* e 50 casais-pacientes e 68 casais-controle para o exon 8 de *HLA-G*.

A caracterização dos alelos (exons 2 e 3) e das variantes (exon 8) de *HLA-G* nas amostras pacientes e controles nos permitiu comparações entre frequências alélicas, genotípicas, de portadores, haplotípicas e de alelos agrupados.

As amostras apresentaram os seguintes valores de P para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg: Exons 2 e 3: grupo pacientes ($P=0,8991 \pm 0,0004$) e grupo controles ($P=0,9779 \pm 0,0006$). Exon 8: grupo pacientes ($P=0,1179 \pm 0,0010$) e grupo controle ($P=1,0000 \pm 0,0000$).

6.1 RESULTADOS – NÍVEL ALÉLICO

TABELA 04 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS – PACIENTES X CONTROLES

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES					
	n=200 (alelos)		n=174 (alelos)					
ALELOS	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
HLAG*010103	1,0	2	4,6	8	0,0557	0,0025	NC	NC
HLAG*010107	0,0	0	0,6	1	0,4688	0,0014	NC	NC
HLAG*010108	23,5	47	18,4	32	0,2554	0,0100	NC	NC
HLAG*0101A	25,5	51	33,3	58	0,1066	0,0077	NC	NC
HLAG*0103	10,0	20	6,3	11	0,2669	0,0068	NC	NC
HLAG*010401	13,5	27	9,2	16	0,2599	0,0062	NC	NC
HLAG*010403	3,5	7	0,0	0	0,0165 ^{CH}	0,0004	13,53	0,7-238,5
HLAG*0105N	2,5	5	2,3	4	1,0000	0,0000	NC	NC
HLAG*01B	20,5	41	25,3	44	0,3373	0,0105	NC	NC

EXON 8	PACIENTES		CONTROLES					
	n=200 (alelos)		n=272 (alelos)					
VARIANTES	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
14	34,0	68	40,4	110	0,1835	0,0148	NC	NC
del	66,0	132	59,6	162	0,1760	0,0120	NC	NC

^{CH} Correção de Haldane - *HLA-G*0101A=HLA-G*010101 e ou HLA-G*010106 – HLA-G*01B=HLA-G*010102 e ou HLA-G*0106* – NC=Não Calculado – S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

Foi observado um valor de P próximo à significância ($P=0,0557$) para a maior frequência do alelo *HLA-G*010103* no grupo controle (4,6%) em relação ao grupo pacientes

(1%). Também observou-se um número significativamente ($P=0,0165$ – $OR=13,53$) elevado do alelo *HLA-G*010403* no grupo pacientes (3,5%), quando comparado ao grupo controle (0%), Tabela 04.

Foram comparadas as frequências alélicas encontradas no grupo paciente feminino com as encontradas no grupo controle feminino (Tabela 05). Observou-se uma frequência significativamente maior ($P=0,0307$) de alelos do grupo *G*0101A* no grupo controle feminino (40%) quando comparado ao grupo paciente feminino (25%).

Realizou-se também a análise de comparação das frequências alélicas dos grupos pacientes masculinos e controle masculino, o que resultou nos dados mostrados na Tabela 06; entretanto, e não observou-se qualquer associação significativa.

TABELA 05 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS – PACIENTES FEMININOS X CONTROLES FEMININOS

CONTROLES FEMININOS								
EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES					
	FEMININOS		FEMININOS					
	n=100 (alelos)		n=90 (alelos)					
ALELOS	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
G*010103	1,0	1	4,4	4	0,1939	0,0028	NC	NC
G*010108	19,0	19	16,6	15	0,7051	0,0041	NC	NC
G*0101A	25,0	25	40,0	36	0,0307	0,0009	0,50	0,27-0,93
G*0103	13,0	13	6,6	6	0,2250	0,0013	NC	NC
G*010401	13,0	13	5,5	5	0,1039	0,0047	NC	NC
G*010403	4,0	4	0,0	0	0,1279	0,0026	NC	NC
G*0105N	4,0	4	3,3	3	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B	21,0	21	23,3	21	0,7272	0,0054	NC	NC
EXON 8	PACIENTES		CONTROLES					
	FEMININOS		FEMININOS					
	n=100 (alelos)		n=136 (alelos)					
VARIANTES	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
14	38,0	38	39,4	54	0,7871	0,0044	NC	NC
del	62,0	62	60,6	82	0,8863	0,0028	NC	NC

*HLA-G*0101A=HLA-G*010101 e ou HLA-G*010106 – HLA-G*01B=HLA-G*010102 e ou HLA-G*0106*

NC=Não Calculado - S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

TABELA 06 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS – PACIENTES MASCULINOS X CONTROLES MASCULINOS

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	MASCULINOS		MASCULINOS					
	n=100 (alelos)		n=84 (alelos)					
ALELOS	%	Nº	%	Nº				
G*010103	1,0	1	4,8	4	0,1810	0,0029	NC	NC
G*010107	0,0	0	1,2	1	0,4564	0,0023	NC	NC
G*010108	28,0	28	20,3	17	0,2217	0,0069	NC	NC
G*0101A	26,0	26	26,2	22	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0103	7,0	7	6,0	5	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010401	14,0	14	13,1	11	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010403	3,0	3	0,0	0	0,2518	0,0033	NC	NC
G*0105N	1,0	1	1,2	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B	20,0	20	27,4	23	0,2836	0,0077	NC	NC

EXON 8	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	MASCULINOS		MASCULINOS					
	n=100 (alelos)		n=136 (alelos)					
VARIANTES	%	Nº	%	Nº				
14	30,0	30	41,3	56	0,1091	0,0064	NC	NC
del	70,0	70	58,7	80	0,1062	0,0048	NC	NC

HLA-G*0101A=HLA-G*010101 e ou HLA-G*010106 – HLA-G*01B=HLA-G*010102 e ou HLA-G*0106

NC=Não Calculado - S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

6.2 RESULTADOS – NÍVEL GENOTÍPICO

Foram comparadas as frequências genotípicas (Tabela 07) entre o grupo paciente e o grupo controle, de maneira semelhante àquela realizada em nível alélico. Verificou-se uma frequência maior que a esperada ($P=0,0310$) de genótipos *14-14* no grupo controle (17,6%) em comparação ao observado no grupo pacientes (8%).

Posteriormente, foram comparadas as frequências genotípicas do grupo paciente feminino e do grupo controle feminino. Entretanto, não foi encontrada nenhuma associação significativa ou tendência. Os resultados são mostrados na Tabela 08.

Em seguida, foram analisadas as frequências genotípicas do grupo paciente masculino frente ao grupo controle masculino, onde se obteve os resultados mostrados na Tabela 09. Nesta modalidade de análise, observou-se uma tendência de frequência aumentada dos genótipos *14-14* ($P=0,0880$) no grupo controle masculino (17,6%) quando comparado ao grupo pacientes masculino (6%).

TABELA 07 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS – PACIENTES X CONTROLES

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES					
	n=100		n=87					
GENÓTIPOS	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
G*010103-010108	1,0	1	2,3	2	0,6017	0,0025	NC	NC
G*010103-010401	0,0	0	1,1	1	0,4611	0,0026	NC	NC
G*010108-010108	7,0	7	3,5	3	0,3419	0,0041	NC	NC
G*010108-010401	1,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010108-0105N	2,0	2	0,0	0	0,5010	0,0018	NC	NC
G*0101A-010103	0,0	0	3,5	3	0,1099	0,0022	NC	NC
G*0101A-010107	0,0	0	1,1	1	0,4611	0,0026	NC	NC
G*0101A-010108	11,0	11	10,3	9	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-0101A	6,0	6	11,4	10	0,2030	0,0044	NC	NC
G*0101A-010401	7,0	7	5,7	5	0,7749	0,0029	NC	NC
G*0101A-010403	2,0	2	0,0	0	0,5010	0,0018	NC	NC
G*0101A-0105N	1,0	1	1,1	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-01B	6,0	6	10,3	9	0,2898	0,0067	NC	NC
G*0103-010108	3,0	3	2,3	2	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0103-0101A	7,0	7	4,6	4	0,5467	0,0036	NC	NC
G*0103-0103	1,0	1	1,1	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0103-010401	3,0	3	0,0	0	0,2475	0,0029	NC	NC
G*0103-01B	5,0	5	3,5	3	0,7262	0,0029	NC	NC
G*010401-010108	5,0	5	3,5	3	0,7262	0,0029	NC	NC
G*010401-010401	2,0	2	1,1	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010401-010403	1,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010401-0105N	1,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010401-01B	0,0	0	1,1	1	0,4611	0,0026	NC	NC
G*010403-010108	2,0	2	0,0	0	0,5010	0,0018	NC	NC
G*0105N-010108	0,0	0	1,1	1	0,4611	0,0026	NC	NC
G*01B-0105N	1,0	1	2,3	2	0,6017	0,0025	NC	NC
G*01B-01B	4,0	4	5,7	5	0,7379	0,0029	NC	NC
G*01B-010103	1,0	1	2,3	2	0,6017	0,0025	NC	NC
G*01B-010108	8,0	8	9,2	8	0,7956	0,0031	NC	NC
G*01B-0101A	5,0	5	5,7	5	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B-010401	4,0	4	3,5	3	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B-010403	3,0	3	0,0	0	0,2475	0,0029	NC	NC

EXON 8	PACIENTES		CONTROLES					
	n=100		n=136					
GENÓTIPOS	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
14-14	8,0	8	17,6	24	0,0310	0,0022	0,41	0,17-0,95
14-del	57,0	57	44,8	61	0,0855	0,0068	NC	NC
del-del	35,0	35	37,5	51	0,7886	0,0053	NC	NC

*HLA-G*0101A=HLA-G*010101 e ou HLA-G*010106 – HLA-G*01B=HLA-G*010102 e ou HLA-G*0106*

NC=Não Calculado - S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

TABELA 08 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS – PACIENTES FEMININOS X CONTROLES FEMININOS

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	FEMININOS		FEMININOS					
	n=50		n=45					
GENÓTIPOS	%	Nº	%	Nº				
G*010103-010108	0,0	0	2,2	1	0,4769	0,0030	NC	NC
G*010108-010108	4,0	2	2,2	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010108-0105N	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-010103	0,0	0	4,4	2	0,2237	0,0027	NC	NC
G*0101A-010108	10,0	5	11,1	5	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-0101A	6,0	3	15,5	7	0,1859	0,0044	NC	NC
G*0101A-010401	6,0	3	4,4	2	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-010403	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-0105N	2,0	1	2,2	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-01B	0,0	0	6,6	3	0,1039	0,0024	NC	NC
G*0103-010108	4,0	2	2,2	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0103-0101A	8,0	4	6,6	3	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0103-0103	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0103-010401	4,0	2	0,0	0	0,4962	0,0021	NC	NC
G*0103-01B	6,0	3	4,4	2	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010401-010108	4,0	2	2,2	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010401-010401	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010401-010403	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010401-0105N	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010401-01B	0,0	0	2,2	1	0,4769	0,0030	NC	NC
G*010403-010108	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0105N-010108	0,0	0	2,2	1	0,4769	0,0030	NC	NC
G*01B-010103	2,0	1	2,2	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B-010108	8,0	4	6,6	3	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B-0101A	10,0	5	11,1	5	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B-010401	4,0	2	0,0	0	0,4962	0,0021	NC	NC
G*01B-010403	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B-0105N	2,0	1	2,2	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B-01B	4,0	2	4,4	2	1,0000	0,0000	NC	NC

EXON 8	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	FEMININOS		FEMININOS					
	n=50		n=68					
GENÓTIPOS	%	Nº	%	Nº				
14-14	10,0	5	17,6	12	0,2899	0,0002	NC	NC
14-del	56,0	28	42,7	29	0,1970	0,0053	NC	NC
del-del	34,0	17	39,7	27	0,5639	0,0063	NC	NC

*HLA-G*0101A=HLA-G*010101 e ou HLA-G*010106 – HLA-G*01B=HLA-G*010102 e ou HLA-G*0106*

NC=Não Calculado - S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

TABELA 09 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS – PACIENTES MASCULINOS X CONTROLES MASCULINOS

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	MASCULINOS		MASCULINOS					
	n=50		n=42					
GENÓTIPOS	%	Nº	%	Nº				
G*010103-010108	2,0	1	2,4	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010103-010401	0,0	0	2,4	1	0,4557	0,0022	NC	NC
G*010108-010108	10,0	5	4,8	2	0,4485	0,0030	NC	NC
G*010401-010108	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010108-0105N	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-010107	0,0	0	2,4	1	0,4557	0,0022	NC	NC
G*0101A-010103	0,0	0	2,4	1	0,4557	0,0022	NC	NC
G*0101A-010108	10,0	5	9,5	4	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-0101A	6,0	3	7,1	3	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-010401	8,0	4	7,1	3	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-010403	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0101A-01B	12,0	6	14,3	6	0,7660	0,0027	NC	NC
G*0103-010108	2,0	1	2,4	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0103-0101A	6,0	3	2,4	1	0,6226	0,0001	NC	NC
G*0103-0103	0,0	0	2,4	1	0,4557	0,0022	NC	NC
G*0103-010401	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0103-01B	4,0	2	2,4	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010401-010108	6,0	3	4,8	2	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010401-010401	2,0	1	2,4	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010403-010108	2,0	1	0,0	0	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B-010103	0,0	0	2,4	1	0,4557	0,0022	NC	NC
G*01B-010108	8,0	4	11,9	5	0,7198	0,0028	NC	NC
G*01B-010401	4,0	2	7,1	3	0,6581	0,0029	NC	NC
G*01B-010403	4,0	2	0,0	0	0,4972	0,0025	NC	NC
G*01B-0105N	0,0	0	2,4	1	0,4557	0,0022	NC	NC
G*01B-01B	4,0	2	7,1	3	0,6581	0,0029	NC	NC

EXON 8	PACIENTES		CONTROLES					
	MASCULINOS		MASCULINOS					
	n=50		n=68					
GENÓTIPOS	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
14-14	6,0	3	17,6	12	0,0880	0,0031	NC	NC
14-del	58,0	29	47,0	32	1,0000	0,0000	NC	NC
del-del	36,0	18	35,4	24	1,0000	0,0000	NC	NC

*HLA-G*0101A=HLA-G*010101 e ou HLA-G*010106 – HLA-G*01B=HLA-G*010102 e ou HLA-G*0106*

NC=Não Calculado - S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

6.3 RESULTADOS – NÍVEL PORTADORES

Foi realizada a análise da frequência de portadores de cada alelo de *HLA-G* entre o grupo paciente e o grupo controle; os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE PORTADORES – PACIENTES X CONTROLES

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	%	Nº	%	Nº				
<i>HLA-G*010103</i>	2,0	2	9,1	8	0,0480	0,0021	0,20	0,04-0,98
<i>HLA-G*010107</i>	0,0	0	1,1	1	0,4716	0,0025	NC	NC
<i>HLA-G*010108</i>	39,0	39	32,2	28	0,3662	0,0089	NC	NC
<i>HLA-G*0101A</i>	44,0	44	54,0	47	0,1800	0,0085	NC	NC
<i>HLA-G*0103</i>	19,0	19	11,5	10	0,2209	0,0060	NC	NC
<i>HLA-G*010401</i>	24,0	24	16,1	14	0,2011	0,0053	NC	NC
<i>HLA-G*010403</i>	7,0	7	0,0	0	0,0148^{CH}	0,0010	14,04	0,49-249,6
<i>HLA-G*0105N</i>	5,0	5	4,6	4	1,0000	0,0000	NC	NC
<i>HLA-G*01B</i>	37,0	37	43,7	38	0,3798	0,0079	NC	NC

EXON 8	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	%	Nº	%	Nº				
<i>14</i>	64,0	64	59,6	81	0,5028	0,0097	NC	NC
<i>del</i>	91,0	91	77,8	106	0,0076	0,0001	2,86	1,29-6,34

^{CH} Correção de Haldane - *HLA-G*0101A=HLA-G*010101 e ou HLA-G*010106 – HLA-G*01B=HLA-G*010102 e ou HLA-G*0106* - NC=Não Calculado - S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

Observou-se um número absoluto significativamente maior ($P=0,0480$ – $OR=0,20$) de indivíduos com o alelo *HLA-G*010103* entre o grupo controle (9,1%) em relação ao grupo paciente (2%). Também verificou-se que o grupo paciente apresentou 7 (7%) indivíduos com o alelo *HLA-G*010403*, o que não foi observado no grupo controle ($P=0,0148$ – $OR=14,04$). Foi encontrada, também, uma maior frequência da variante *del* no exon 8 de *HLA-G* no grupo paciente (91%) contra 77,8% no grupo controle, ($P=0,0076$ – $OR=2,86$).

A mesma análise foi realizada entre os grupos paciente feminino e grupo controle feminino, na qual foi verificada uma tendência ($P=0,0594$) de frequência aumentada de indivíduos com o alelo *HLA-G*010401* no grupo paciente feminino (24%) em relação ao grupo controle feminino (8,8%), conforme mostrado na Tabela 11.

TABELA 11 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE PORTADORES – PACIENTES FEMININOS X CONTROLES FEMININOS

CONTROLES FEMININOS								
EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES					
	FEMININOS		FEMININOS					
	n=50		n=45					
ALELOS	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
G*010103	2,0	1	8,8	4	0,1867	0,0034	NC	NC
G*010108	34,0	17	28,8	13	0,6597	0,0045	NC	NC
G*0101A	44,0	22	62,2	28	0,1098	0,0045	NC	NC
G*0103	24,0	12	13,3	6	0,2083	0,0044	NC	NC
G*010401	24,0	12	8,9	4	0,0594	0,0008	NC	NC
G*010403	8,0	4	0,0	0	0,1197	0,0007	NC	NC
G*0105N	8,0	4	6,6	3	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B	38,0	19	40,0	18	1,0000	0,0000	NC	NC
EXON 8	PACIENTES		CONTROLES					
	FEMININOS		FEMININOS					
	n=50		n=68					
VARIANTES	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
14	66,0	33	58,8	40	0,4521	0,0073	NC	NC
del	90,0	45	79,4	54	0,1387	0,0055	NC	NC

*HLA-G*0101A=HLA-G*010101 e ou HLA-G*010106 – HLA-G*01B=HLA-G*010102 e ou HLA-G*0106*

NC=Não Calculado - S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

A distribuição das frequências de portadores de cada alelo e variante de *HLA-G* no grupo paciente masculino e grupo controle masculino (Tabela 12) mostrou uma frequência significativamente maior ($P=0,0268$ – $OR=3,54$) de indivíduos com a variante *del* do exon 8 de *HLA-G* no grupo paciente masculino (92%) em relação ao grupo controle masculino (76,4%).

TABELA 12 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE PORTADORES – PACIENTES MASCULINOS X CONTROLES MASCULINOS

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	MASCULINOS		MASCULINOS					
	n=50		n=42					
	ALELOS	%	Nº	%				
G*010103	2,0	1	9,5	4	0,1760	0,0035	NC	NC
G*010107	0,0	0	2,4	1	0,4577	0,0019	NC	NC
G*010108	44,0	22	35,7	15	0,5263	0,0066	NC	NC
G*0101A	44,0	22	45,2	19	1,0000	0,0000	NC	NC
G*0103	14,0	7	9,5	4	0,7502	0,0029	NC	NC
G*010401	24,0	12	23,8	10	1,0000	0,0000	NC	NC
G*010403	6,0	3	0,0	0	0,2503	0,0030	NC	NC
G*0105N	2,0	1	2,4	1	1,0000	0,0000	NC	NC
G*01B	36,0	18	47,6	20	0,3029	0,0063	NC	NC

EXON 8	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	MASCULINOS		MASCULINOS					
	n=50		n=68					
VARIANTES	%	Nº	%	Nº				
14	62,0	31	60,3	41	1,0000	0,0000	NC	NC
del	92,0	46	76,4	52	0,0268	0,0019	3,54	1,1-11,3

*HLA-G*0101A=HLA-G*010101 e ou HLA-G*010106 – HLA-G*01B=HLA-G*010102 e ou HLA-G*0106*

NC=Não Calculado - S=Erro Padrão - OR=Odds Ratio - IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

6.4 RESULTADOS – NÍVEL HAPLOTÍPICO

Foi calculada a frequência haplotípica para os grupos paciente e controle, cujos resultados são apresentados na Tabela 13. Observou-se associação negativa ($P=0,0215$) do haplótipo *G*0101A-14* com o ARE, apresentando frequência de 0% no grupo paciente e de 2,5% no grupo controle, (OR=0,07 ou risco 14,2 vezes maior de ARE para os indivíduos que não portam o haplótipo).

Verificou-se também uma tendência ($P=0,0632$) próxima ao limiar de significância para o haplótipo *G*010403-del* na comparação entre o grupo paciente e o grupo controle.

TABELA 13 – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS HAPLÓTIPICAS - PACIENTES X CONTROLES

HAPLÓTIPOS	PACIENTES n=200 (haplótipos)		CONTROLES n=168 (haplótipos)		P	S	OR	IC 95%
	%	Nº	%	Nº				
<i>G*010103-14</i>	1,5	3	4,1	7	0,1062	0,0020	NC	NC
<i>G*010107-14</i>	0,0	0	0,6	1	1,0000	0,0000	NC	NC
<i>G*010108-14</i>	1,5	3	0,8	1	0,6277	0,0024	NC	NC
<i>G*0101A-14</i>	0,0	0	2,7	5	0,0215	0,0014	0,07	0,0-1,35
<i>G*0103-14</i>	8,5	17	6,5	11	0,5528	0,0058	NC	NC
<i>G*010401-14</i>	0,1	0	1,2	2	0,2109	0,0033	NC	NC
<i>G*010403-14</i>	0,9	2	0,0	0	0,5060	0,0021	NC	NC
<i>G*0105N-14</i>	2,0	4	2,4	4	1,0000	0,0000	NC	NC
<i>G*01B-14</i>	20,7	41	25,5	43	0,3231	0,0071	NC	NC
<i>G*010103-del</i>	0,0	0	0,6	1	1,0000	0,0000	NC	NC
<i>G*010108-del</i>	21,5	43	16,4	28	0,2180	0,0091	NC	NC
<i>G*0101A-del</i>	25,3	50	31,1	52	0,2370	0,1183	NC	NC
<i>G*0103-del</i>	1,5	3	0,0	0	0,2534	0,0039	NC	NC
<i>G*010401-del</i>	13,6	27	7,7	13	0,1086	0,0048	NC	NC
<i>G*010403-del</i>	2,6	5	0,0	0	0,0632	0,0016	NC	NC
<i>G*0105N-del</i>	0,5	1	0,2	0	1,0000	0,0000	NC	NC

*HLA-G*0101A=HLA-G*010101 e ou HLA-G*010106 – HLA-G*01B=HLA-G*010102 e ou HLA-G*0106*

NC=Não Calculado - S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

Não foram observadas associações significativas ou próximas ao limiar de significância nas comparações entre o grupo paciente feminino e o grupo controle feminino, o mesmo ocorrendo na comparação do grupo paciente masculino e o grupo controle masculino (resultados não mostrados).

6.5 RESULTADOS – ALELOS AGRUPADOS

Para investigar uma possível associação entre as substituições nucleotídicas não sinônimas (códon 31, 110 e 130) e o ARE, foi realizado um estudo agrupando todos os alelos observados que possuam substituição ou deleção nucleotídica nos códon citados (*HLA-G*0103*, *HLA-G*010401*, *HLA-G*010403* e *HLA-G*0105N*). Todos os demais alelos foram reunidos num segundo grupo e em seguida foram comparadas as frequências alélicas, genotípicas, de portadores e haplotípicas do grupo paciente em relação ao grupo controle.

Foi observada associação negativa do grupo de alelos com substituição sinônima com o ARE, apresentando maior frequência no grupo controle em comparação ao grupo

paciente ($P=0,0114$ – $OR=0,53$ ou risco 1,88 vezes maior de abortamento para os indivíduos que possuem alelos com substituição não sinônima; Tabela 14). Também observou-se associação negativa com ARE ($P=0,0039$) quando foram comparadas as frequências alélicas do grupo paciente feminino e do grupo controle feminino ($OR=0,36$ ou risco 2,7 vezes maior de abortamento para o grupo de alelos com substituições não sinônimas; Tabela 14).

Verificou-se associação positiva com ARE para as substituições não sinônimas (grupo de alelos) quando se comparou as frequências alélicas do grupo paciente e do grupo controle ($P=0,0110$ – $OR=1,93$ ou risco quase duas vezes maior de abortamento para o grupo com substituições nucleotídicas não sinônimas; Tabela 14). Resultado semelhante foi encontrado para a comparação entre o grupo paciente feminino e o grupo controle feminino ($P=0,0017$ – $OR=2,80$ ou risco 2,8 vezes maior de ARE para o grupo de alelos com substituição nucleotídica não sinônima; Tabela 14).

TABELA 14 – ALELOS AGRUPADOS – COMPARAÇÕES DE FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES					
	n=200 (alelos)		n=174 (alelos)					
SUBSTITUIÇÃO	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
SINÔNIMA ¹	70,5	141	82,2	143	0,0114	0,0019	0,53	0,32-0,85
NÃO SINÔNIMA ²	29,5	59	17,8	31	0,0110	0,0020	1,93	1,18-3,16

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES					
	FEMININOS		FEMININOS					
	n=100 (alelos)		n=90 (alelos)					
SUBSTITUIÇÃO	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
SINÔNIMA ¹	66,0	66	84,3	76	0,0039	0,0006	0,36	0,18-0,72
NÃO SINÔNIMA ²	34,0	34	15,7	14	0,0017	0,0004	2,80	1,38-5,66

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES					
	MASCULINOS		MASCULINOS					
	n=100 (alelos)		n=84 (alelos)					
SUBSTITUIÇÃO	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
SINÔNIMA ¹	75,0	75	79,9	67	0,4862	0,0078	NC	NC
NÃO SINÔNIMA ²	25,0	25	20,1	17	0,4748	0,0062	NC	NC

¹ Grupo de Alelos de HLA-G com Substituição Sinônima – ² Grupo de Alelos de HLA-G com Substituição Não Sinônima

S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

Foram comparadas as frequências genotípicas entre o grupo paciente e o grupo controle, os resultados são apresentados na Tabela 15.

Verificou-se associação negativa entre o genótipo homozigoto para alelos com substituições sinônimas e o ARE quando se comparou o grupo paciente e o grupo controle ($P=0,0082$ – $OR=0,44$ ou risco 2,27 vezes maior para os indivíduos que não portam esse genótipo; Tabela 15). Resultado semelhante foi observado na comparação entre o grupo paciente feminino e o grupo controle feminino ($P=0,0193$ – $OR=0,35$ ou risco 2,85 vezes maior de ARE para os indivíduos não homozigotos para os alelos com substituição nucleotídica sinônima. (Tabela 15).

Associação positiva entre o genótipo heterozigoto (alelo com substituição nucleotídica sinônima e alelo com substituição nucleotídica não sinônima) e ARE foi observada na comparação entre o grupo paciente e o grupo controle ($P=0,0165$ – $OR=1,77$ ou risco 1,77 vezes maior de ARE para indivíduos que apresentam o genótipo heterozigoto; Tabela 15). Também foi observada associação positiva entre o genótipo heterozigoto e ARE na comparação entre o grupo paciente feminino e o grupo controle feminino ($P=0,0205$ – $OR=1,74$ ou risco 1,74 vezes maior de ARE para os indivíduos com esse genótipo; Tabela 15).

Foi encontrada associação positiva entre o genótipo homozigoto para alelos com substituição nucleotídica não sinônima e ARE na comparação entre o grupo paciente feminino e o grupo controle feminino ($P=0,0284$ – $OR=13,28$ ou risco 13,28 maior de ARE para os indivíduos com este genótipo; Tabela 15).

TABELA 15 – ALELOS AGRUPADOS – COMPARAÇÕES DE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	n=100		n=87					
SUBSTITUIÇÃO	%	Nº	%	Nº				
S/S ¹	48,0	48	67,8	59	0,0082	0,0020	0,44	0,24-0,80
S/NS ²	43,0	43	29,8	26	0,0165	0,0020	1,77	0,97-3,25
NS/NS ³	3,0	8	2,4	2	0,1061	0,0031	NC	NC

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	FEMININOS		FEMININOS					
	n=50		n=45					
SUBSTITUIÇÃO	%	Nº	%	Nº				
S/S ¹	44,0	22	68,8	31	0,0193	0,0020	0,35	0,15-0,82
S/NS ²	44,0	22	31,2	14	0,0205	0,0062	1,74	0,75-4,04
NS/NS ³	12,0	6	0,0	0	0,0284	0,0013	13,29 ^H	0,73-243,1

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES		P	S	OR	IC 95%
	MASCULINOS		MASCULINOS					
	n=50		n=42					
SUBSTITUIÇÃO	%	Nº	%	Nº				
S/S ¹	52,0	26	66,6	28	0,1968	0,0040	NC	NC
S/NS ²	44,0	22	28,6	12	0,1346	0,0044	NC	NC
NS/NS ³	4,0	2	4,8	2	1,0000	0,0000	NC	NC

¹ Grupo Homozigoto para Alelos com Substituições Sinônimas – ² Grupo Heterozigoto para Alelos com Substituições

Sinônimas e Não Sinônimas – ³ Grupo Homozigoto para Alelos com Substituições Não Sinônimas – NC = Não Calculado

^H Correção de Haldane - S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

Foram comparadas as frequências de portadores dos alelos com substituição nucleotídica sinônima e não sinônimas observadas no grupo controle e no grupo paciente. Observou-se um valor de $P=0,0540$ (próximo ao limiar de significância) para a frequência de portadores de alelos com substituição não sinônima no grupo paciente (Tabela 16).

Verificou-se uma associação positiva com ARE ($P=0,0124$) do grupo de alelos com substituições nucleotídicas não sinônimas ($OR=3,13$ ou risco 3,13 vezes maior de ARE para os portadores femininos destes alelos; Tabela 16).

TABELA 16 – ALELOS AGRUPADOS – COMPARAÇÕES DAS FREQUÊNCIAS DE PORTADORES

EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES					
	n=100		n=87					
SUBSTITUIÇÃO	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
SINÔNIMA ¹	92,0	92	95,4	83	0,3822	0,0041	NC	NC
NÃO SINÔNIMA ²	47,0	47	32,2	28	0,0540	0,0052	NC	NC
EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES					
	FEMININOS		FEMININOS					
	n=50		n=45					
SUBSTITUIÇÃO	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
SINÔNIMA ¹	88,0	44	95,5	43	0,2752	0,0034	NC	NC
NÃO SINÔNIMA ²	56,0	28	28,8	13	0,0124	0,0013	3,13	1,34-7,35
EXONS 2 e 3	PACIENTES		CONTROLES					
	MASCULINOS		MASCULINOS					
	n=50		n=42					
SUBSTITUIÇÃO	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
SINÔNIMA ¹	94,0	47	95,2	40	1,0000	0,0000	NC	NC
NÃO SINÔNIMA ²	46,0	23	35,7	15	0,3870	0,0049	NC	NC

¹ Grupo de Alelos de HLA-G com Substituição Sinônima – ² Grupo de Alelos de HLA-G com Substituição Não Sinônima

S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

Com auxílio do programa ARLEQUIN 1.1, calculou-se as combinações haplotípicas mais prováveis entre os alelos de HLA-G tipados (exons 2 e 3) e a variante no exon 8 (*14* ou *del*). Os resultados são mostrados na Tabela 17.

Observou-se uma associação negativa ($P=0,0312$) entre o haplótipo contendo um dos alelos com substituições nucleotídicas sinônimas juntamente com a variante *14* (exon 8) e ARE, obtendo-se um $OR=0,60$, ou risco 1,6 vezes maior de ARE para os indivíduos que portavam outros haplótipos (Tabela 17).

Verificou-se uma associação positiva ($P=0,0045$) entre o haplótipo contendo um dos alelos com substituição não sinônima acompanhado da variante *del* (exon 8) e ARE conferindo ao portador do haplótipo um risco 2,71 vezes maior de ARE ($OR=2,71$; Tabela 17).

TABELA 17 – ALELOS AGRUPADOS – COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS

EXONS 2,3 e 8	PACIENTES		CONTROLES					
	n=200 (haplótipos)		n=168 (haplótipos)					
HAPLÓTIPOS	%	Nº	%	Nº	P	S	OR	IC 95%
<i>S-14</i> ¹	23,7	47	33,7	57	0,0312	0,0039	0,60	0,38-0,94
<i>NS-del</i> ²	18,2	37	7,9	13	0,0045	0,0008	2,71	1,39-5,28
<i>OUTROS</i> ³	58,1	116	58,7	98	1,0000	0,0000	NC	NC

¹ Substituição Sinônima (exons 2 e 3 de HLA-G) + Variante sem a deleção de 14pb (Exon 8 de HLA-G) – ² Substituição Não

Sinônima (exons 2 e 3 de HLA-G) + Variante com deleção de 14pb (Exon 8 de HLA-G) – ³ Todos os demais haplótipos –

NC = Não Calculado - S=Erro Padrão – OR=Odds Ratio – IC 95%=Intervalo de Confiança de 95%

7. DISCUSSÃO

No contexto da imunologia dos transplantes, sabe-se que a sobrevivência de aloenxertos em mamíferos é influenciada por genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade e que, em humanos, a incompatibilidade associada aos genes que codificam os Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) conduz à rápida rejeição dos tecidos estranhos. Uma notável exceção é a gestação, durante a qual tecidos fetais alogênicos conseguem escapar à rejeição que poderia ser induzida pelo sistema imunológico materno ao reconhecer antígenos paternos presentes no feto.

No abortamento recorrente espontâneo (ARE), além dos fatores ambientais, fatores genéticos específicos podem estar afetando o desenvolvimento embrionário. Sabendo-se que a frequência de ocorrência de um abortamento espontâneo é de aproximadamente 15%, a probabilidade de que uma mulher tenha dois abortamentos é o quadrado da probabilidade de ocorrência de um aborto $(0,15)^2$ ou 2,3%, enquanto que a probabilidade de ocorrência de um terceiro abortamento seria $(0,15)^3$ ou 0,3%, considerando-se os eventos como independentes. No entanto, a prevalência de mulheres com três abortamentos espontâneos consecutivos varia de 0,4% a 1%, uma incidência mais alta do que a esperada se os eventos ocorressem ao acaso (WARBUTON e FRASER, 1964; COULAN e STERN, 1994; FORBES, 1996).

O propósito desse estudo foi investigar um possível papel do polimorfismo do gene *HLA-G* no sucesso gestacional. Comparamos as distribuições alélicas, genotípicas, de portadores e haplotípicas dos alelos de *HLA-G* observadas em casais brasileiros com abortamento recorrente espontâneo e seus controles. A discussão dos resultados obtidos no presente estudo focalizará cada alelo individualmente, reportando os diferentes níveis investigados (alélico, genotípico, portadores e haplotípicos) e interpretando nossos resultados através de comparações com estudos semelhantes disponíveis na literatura. *HLA-G* parece atuar no processo de tolerância materno-fetal regulando, de modo dose-dependente, o perfil de citocinas através da interação com receptores de células do sistema imune (possivelmente células NK). Baixas concentrações de *HLA-G* resultariam em um aumento da resposta de linfócitos T alogotóxicos e a indução de um perfil de citocinas do tipo Th1, enquanto altas

concentrações suprimiriam a resposta aloцитotóxica e induziria um perfil de citocinas do tipo Th2 (HVIID et al., 2005). Os diferentes alelos de *HLA-G* poderiam estar atuando de forma diferente na indução da tolerância materno-fetal. Certas substituições nucleotídicas que ocorrem no domínio $\alpha 1$ (exon 2 – códon 31) e no domínio $\alpha 2$ (exon 3 – códons 110 e 130) da proteína *HLA-G* resultam na alteração da sequência de aminoácidos. As demais substituições nucleotídicas encontradas nos exons estudados podem influenciar o processamento alternativo do ARNm de *HLA-G* (CHOUDHURY et al. 2000).

Investigamos também o polimorfismo de 14pb (deleção/ausência de deleção) presente no exon 8 de *HLA-G* (3'UTR), no qual a presença da sequência de 14pb parece estar associada com um padrão diferenciado de expressão de ARNm, sofrendo processamento alternativo e perdendo 92pb da sequência de ARNm de 3'UTR. As isoformas geradas por alelos com deleção de 14pb daquela região mantém a sequência de 92pb do ARNm e parecem ser menos estáveis (HVIID et al. 2002). A deleção de 14pb, segundo ROUSSEAU et al. (2003), parece ser um polimorfismo recente, sendo encontrada em humanos, mas não em outras espécies de primatas.

Com relação ao alelo *HLA-G*010103*, observamos uma maior frequência na amostra controle (4,6%) quando comparado ao grupo paciente (1%), Tabela 01. As análises revelaram um valor de P (0,0557) próximo ao limiar de significância caracterizando uma associação negativa entre *HLA-G*010103* e ARE. Nossos dados nos permitiram concluir por uma associação negativa (P=0,0480 – OR=0,20 ou risco 5 vezes menor para os portadores) do alelo *HLA-G*010103* que no grupo controle apresentou uma frequência de 9% quando comparado ao grupo paciente (2%), Tabela 10. Os trabalhos publicados têm se mostrado contraditórios quando se referem ao papel do alelo em questão no processo gestacional. PFEIFFER et al. (2001) relataram uma frequência aumentada do alelo *HLA-G*010103* no grupo de mulheres com ARE em comparação com o grupo de mulheres controle, estando o alelo correlacionado com baixos níveis da proteína *HLA-G* solúvel (sHLA-G), quando presente em homozigose. HVIID et al. (2002) não encontraram associação entre *G*010103* e ARE em um estudo com 61 mulheres Dinamarquesas com ARE e 47 mulheres Dinamarquesas controles. ALDRICH et al. (2001) também não encontraram associação de

*HLA-G*010103* e ARE em uma amostra de 113 casais com abortamento. YAMASHITA et al. (1999) observaram uma frequência de 13% do alelo *HLA-G*010103* entre os casais pacientes e de 6% entre os casais controles. ABBAS et al. (2004) demonstraram, em um estudo com 300 mulheres indianas com ARE, uma frequência elevada do alelo *HLA-G*010103* no grupo de mulheres com ARE (9,5%) em comparação ao grupo de mulheres controle (5%). Entretanto, PENZES et al (1999) mostraram uma tendência oposta, com frequência alélica de 12,5% no grupo controle e de 2,4% no grupo paciente. Os dados obtidos por BICALHO (2001) com a metodologia de PCR-SSO, utilizando as mesmas amostras empregadas neste estudo, mostraram uma tendência de frequência aumentada do alelo *HLA-G*010103* no grupo controle em comparação com o grupo paciente, dados estes que são corroborados pelo presente trabalho. O alelo *HLA-G*010103* apresenta uma adenina no lugar de uma guanina na terceira base do códon 57 (CAG) e uma substituição de adenina por timina na terceira base do códon 107 (GGA), o que não acarreta troca de aminoácidos, originando uma sequência idêntica à gerada pelo alelo *HLA-G*010101*. No presente estudo a frequência observada do alelo *HLA-G*010103* para o grupo controle foi semelhante às verificadas para a maioria das populações mostradas na Tabela 01, enquanto que o grupo paciente apresentou o alelo com frequência bastante inferior. Controvérsias com relação às associações observadas nos diferentes estudos podem ser atribuídas: (1) ao acaso; (2) populações etnicamente diferentes e desequilíbrio de ligação de *HLA-G*010103* com um alelo de outro locus que diretamente afeta a expressão do fenótipo; (3) variações atribuídas à sub-estratificações nas amostras controle e paciente; (4) desvios atribuídos à seleção dos controles; (5) heterogeneidade clínica na amostra paciente; (6) deriva genética; (7) tamanho amostral; (8) erros atribuídos à considerações de resultados que utilizam nível de significância de 5%.

Foi observada a presença do alelo *HLA-G*010403* no grupo paciente (3,5%) e sua total ausência no grupo controle, Tabela 04. A análise estatística do resultado nos permitiu concluir que o mesmo era significativo ($P=0,0165$ – $OR=13,53$, ou seja, o alelo confere um risco 13,53 vezes maior de abortamento). Resultado semelhante foi encontrado no nível portadores (Tabela 10), onde a frequência encontrada foi de 7% no grupo paciente e de 0% no grupo controle ($P=0,0148$ – $OR=14,04$ ou risco 14,04 vezes maior de abortamento para os

portadores do alelo). Uma tendência de associação positiva ($P=0,0632$) entre o haplótipo *G*010403-del* e ARE foi encontrada na comparação entre o grupo paciente e o grupo controle, no nível haplotípico (Tabela 13). Outra tendência ($P=0,0594$) de associação positiva foi encontrada nos indivíduos com o alelo *HLA-G*010401* do grupo paciente feminino (24%), nível portadores, em comparação com o grupo controle feminino (8,8%), conforme Tabela 11. HVIID et al. (2002) verificaram uma frequência de 2% do alelo *HLA-G*010403* no grupo de mulheres dinamarquesas com 5 ou mais ARE, comparado com a completa ausência no grupo de mulheres controle. ALDRICH et al. (2001), em seu trabalho de genotipagem de 113 casais com ARE, evidenciaram a associação positiva do grupo de alelos *G*0104* com abortamento ($OR=3,62$) e ABBAS et al. (2004) mostraram uma frequência de 21,2% do grupo de alelos *G*0104* no grupo de mulheres indianas com ARE e de 17,5% no grupo de mulheres controle. O grupo de alelos *G*0104* (*HLA-G*010401*, *HLA-G*010402* e *HLA-G*010403*) apresenta distribuição bastante variada nas diferentes populações (Tabela 01) e é definido pela substituição de uma citosina por adenina no códon 110, ocasionando a troca de uma leucina por uma isoleucina no domínio $\alpha 2$, o qual é codificado pelo exon 3. Os dados sugerem que pode haver, de fato, uma diferença funcional entre os alelos desse grupo e os demais; além disso, demonstram que as isoformas *HLA-G1* podem ter um papel crítico na tolerância materno-fetal. Segundo PAZMANY et al. (1996), HIBY et al. (1997) e SASAKI et al. (1999), uma das funções documentadas da isoforma *HLA-G1* é a sua interação com receptores específicos de inibição de células NK (receptores KIR). Entretanto, a isoforma *HLA-G1* tem demonstrado ser capaz de inibir células T de outras maneiras, incluindo a indução de apoptose (FOURNEL et al., 2000), redução da citotoxicidade de modo dependente da concentração (KAPASI et al., 2000; MCLNTIRE; HUNT, 2005) e supressão da resposta alo-proliferativa (BAINBRIDGE et al., 2000; MCLNTIRE; HUNT, 2005). É possível que a substituição de aminoácido na posição 110 diminua a eficiência com a qual a molécula *HLA-G1* liga e/ou inibe células NK ou células T.

Verificou-se a associação negativa entre o genótipo *14-14* (variante do exon 8 de *HLA-G*) e ARE no grupo paciente (8%) em comparação ao grupo controle (17,6%), com $P=0,0310$ e $OR=0,41$, ou risco de abortamento 2,43 vezes maior para os indivíduos que não

possuem o genótipo (Tabela 07). Resultado parecido, mas não significativo, foi observado no grupo paciente masculino e no grupo controle masculino ($P=0,0880$) com frequências genótípicas, respectivamente, de 6% e de 17,6% (Tabela 09). Na análise do nível portadores (Tabela 10), foi observada uma associação positiva ($P=0,0076$) de portadores da variante *del* e ARE no grupo paciente (91%) comparada ao grupo controle (77,8%), com um $OR=2,86$, ou risco 2,86 vezes maior de abortamento para os portadores da variante. Foi evidenciada ainda a associação positiva ($P=0,0268$) de indivíduos que portam a variante *del* com o ARE no grupo paciente masculino (92%) em relação ao grupo controle masculino (76,4%), apresentando um $OR=3,54$, ou 3,54 vezes mais risco de abortamento para os portadores da variante *del* do exon 8 de *HLA-G* (Tabela 12). HVIID et al (2002) encontraram em seu estudo um resultado contraditório, com uma maior frequência do genótipo *14-14* no grupo de mulheres com ARE quando comparado ao grupo controle feminino; entretanto, o resultado não foi estatisticamente significativo ($P=0,0820$). Em um estudo mais recente HVIID et al., (2004a) associaram positivamente ($P<0,01$) a variante 14 ao ARE. ROUSSEAU et al (2003) e HIBY et al (1999) demonstram, em seus trabalhos, que os alelos de *HLA-G* que portam a sequência de 14pb estão sujeitos a um processamento alternativo que remove 92pb da 3'UTR, o que conferiria maior estabilidade ao ARNm de *HLA-G*, de modo que a sequência de 14pb funcionaria como um sítio de “splicing”. HVIID et al (2004b) evidenciaram uma significativa associação ($P=0,0300$) entre o genótipo *14-14* e a média de peso da placenta no momento do nascimento. Placentas com o genótipo *14/14* apresentaram um peso, em média, 100g superior ao peso das placentas com os outros dois genótipos. O mesmo estudo também encontrou associação do genótipo *14-14* com o peso da criança observado no momento do nascimento ($P=0,0200$), sendo o peso do indivíduo portador do genótipo *14-14* sempre superior ao peso dos portadores dos outros dois genótipos. Portanto, o genótipo *14-14* poderia favorecer, possivelmente pela maior estabilidade da molécula de ARNm, o desenvolvimento gestacional sem complicações, enquanto que a variante *del*, quando presente, parece diminuir a concentração das isoformas de proteínas HLA-G presentes na interface materno-fetal. Serão necessários estudos posteriores para elucidar a possível influência das variantes do exon 8 de *HLA-G* no fenômeno do abortamento recorrente. Os resultados contraditórios podem ser

atribuídos aos mesmos fatores anteriormente citados para o alelo *HLA-G*010103*.

Foi observada uma associação negativa ($P=0,0307$) entre o grupo de alelos *HLA-G*0101A* (*HLA-G*010101* e ou *HLA-G*010106*) e ARE no grupo controle feminino (40%) quando comparado ao grupo paciente feminino (25%), obtendo-se um $OR=0,50$, ou seja, um risco 2 vezes maior para os indivíduos que não portam o alelo do grupo (Tabela 05). Foi verificada uma associação negativa ($P=0,0215$) entre o haplótipo *G*0101A-14* e ARE na comparação entre o grupo paciente (0%) e o grupo controle (2,7%) originando um $OR=0,07$ ou risco 14,28 vezes maior de abortamento para os indivíduos que não portam o haplótipo. Aparentemente, o grupo de alelos *HLA-G*0101A* e a variante 14 agem em sinergia, proporcionando um efeito protetor mais pronunciado do que quando presentes isoladamente. O alelo *HLA-G*010101* é o mais freqüente na maioria das populações estudadas: 37% na população portuguesa, 32% na população alemã (Tabela 01) e 32.2% em caucasóides, segundo VAN DER VEM et al. (1998), enquanto que o alelo *HLA-G*010106* é encontrado com freqüências bastante reduzidas nas populações. Aparentemente, os alelos do grupo *HLA-G*0101A* proporcionam uma determinada proteção à gestação pelo fato de seus ARNm não possuírem substituições nucleotídicas que produzam alterações nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ das isoformas de *HLA-G*. ALDRICH et al. (2001) verificaram uma tendência de associação negativa com ARE dos alelos do Grupo *G*0101*, os quais apresentaram uma freqüência mais elevada nos casais com sucesso reprodutivo e uma freqüência reduzida nos casais com abortamento. Entretanto esta observação não foi estatisticamente significativa ao nível de 5%. E HVIID et al., (2002) e ABBAS et al., (2004) não evidenciaram associação do alelo *HLA-G*010101* com ARE.

Para investigar a influência das substituições nucleotídicas não sinônimas (códon 31, 110 e 130) no fenômeno do ARE, foram agrupados os alelos *HLA-G*0103*, *HLA-G*010401*, *HLA-G*010403* e *HLA-G*0105N*. Em outro grupo, foram reunidos todos os alelos ou sub-grupos que possuem somente substituições nucleotídicas sinônimas: *HLA-G*0101A*, *HLA-G*01B*, *HLA-G*010103*, *HLA-G*010107* e *HLA-G*010108*. Foram comparadas as freqüências alélicas, genotípicas, de portadores e haplotípicas entre o grupo paciente e o grupo controle. Foram observadas associações negativas entre o grupo de alelos com substituições

nucleotídicas sinônimas e ARE: na comparação entre as frequências alélicas do grupo paciente e do grupo controle ($P=0,0114$ – $OR=0,53$, Tabela 14); na comparação entre as frequências alélicas entre o grupo paciente feminino e o grupo controle feminino ($P=0,0039$ – $OR=0,36$, Tabela 14); na comparação entre as frequências genotípicas de homozigotos para alelos com substituições nucleotídicas sinônimas do grupo paciente e do grupo controle ($P=0,0082$ – $OR=0,44$, Tabela 15); na comparação das frequências genotípicas de homozigotos para substituição sinônima no grupo paciente feminino e no grupo controle feminino ($P=0,0193$ – $OR=0,35$, Tabela 15); na comparação entre as frequências haplotípicas entre o grupo paciente e o grupo controle, estando o haplótipo que apresenta um dos alelos com substituições nucleotídicas sinônimas e a variante 14 (exon 8) presente em uma frequência mais elevada no grupo controle (33,7%) do que no grupo paciente (23,7%) e apresentando um valor de $P=0,0312$ e $OR=0,60$ (Tabela 17). Foram observadas associações positivas com ARE do grupo de alelos com substituições nucleotídicas não sinônimas: na comparação entre as frequências alélicas do grupo paciente e do grupo controle ($P=0,0110$ – $OR=1,93$, Tabela 14); na comparação entre as frequências alélicas do grupo paciente feminino e do grupo controle feminino ($P=0,0017$ – $OR=2,8$); na comparação entre a frequência do genótipo heterozigoto no grupo paciente e no grupo controle ($P=0,0165$ – $OR=1,77$, Tabela 15); na comparação entre a frequência do genótipo heterozigoto (substituição sinônima e substituição não sinônima) no grupo paciente feminino e no grupo controle feminino ($P=0,0205$ – $OR=1,74$, Tabela 15); na comparação entre a frequência de homozigotos para alelos com substituição não sinônima no grupo paciente feminino e grupo controle feminino ($P=0,0284$ – $OR=13,28$, Tabela 15); na comparação da frequência de portadores dos alelos com substituição não sinônima entre o grupo paciente e o grupo controle ($P=0,0124$ – $OR=3,13$, Tabela 16); na comparação das frequências haplotípicas entre o grupo controle e o grupo paciente, sendo o haplótipo formado por um alelo com substituição nucleotídica não sinônima e a variante *del* ($P=0,0045$ – $OR=2,71$, Tabela 17). Foi observada uma tendência de associação positiva com ARE para os portadores de alelos com substituição não sinônima no grupo paciente ($P=0,540$, Tabela 16). Os resultados observados permitem inferir que o desenvolvimento gestacional sem complicações está correlacionado com a manutenção da

seqüência de aminoácidos normal (idêntica à originada pelo alelo *HLA-G*010101*). Portanto, as substituições nucleotídicas não sinônimas que ocorrem nos códons 31, 110 e 130 e alteram aminoácidos presentes nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ das isoformas das proteínas de HLA-G devem, de algum modo, diminuir a eficiência de interação dessas proteínas com as células do sistema imunológico da mãe ou do feto, prejudicando o equilíbrio da imunotolerância na interface materno-fetal (SASAKI et al, 1999). Nesse nível de análise verificou-se, predominantemente, a influência do genótipo materno para a manutenção do processo gestacional, dados que corroboram a observação de CHRISTHIANSEN et al., (1990) de que o parceiro masculino é de pouca relevância para o estabelecimento do ARE. MOREAU et al., (2003) demonstraram que mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica são comuns em *HLA-G*, estando o gene normalmente metilado (inativo) e sofrendo desmetilação (ativação) em determinado processos tumorais e inflamatórios. Com base nestas informações e nos dados obtidos é possível questionar a respeito da possibilidade de um fenômeno de “imprinting” genômico parental que poderia silenciar o alelo de origem paterna. Serão necessários estudos posteriores para responder à esta hipótese.

O alelo *HLA-G*0105N* é caracterizado pela deleção de uma citosina na posição 1597 (1597delC) que causa uma mutação de matriz de leitura no resíduo 130 da proteína e altera a seqüência da metade posterior do exon 3 (domínio $\alpha 2$) de *HLA-G* (OBER et al., 1998). Portanto, as isoformas de HLA-G que retém o exon 3 após o processamento alternativo teriam sua expressão e/ou ação prejudicadas. Alguns trabalhos têm feito referência à associação do alelo nulo com o fenômeno de abortamento, entre eles o de PFEIFFER et al., (2001). Entretanto, a descoberta de indivíduos homozigotos para o alelo tem indicado que a expressão das referidas proteínas não é essencial à sobrevivência do feto (OBER et al., 1998; CASTRO et al., 2000). HVIID et al. (2002) verificaram uma freqüência de 1% para o alelo no grupo controle e de 1,5% no grupo com ARE; entretanto, o resultado não foi significativo ($P=0,723$). No presente trabalho também não foi verificada associação entre o alelo *HLA-G*0105N* e ARE, constatando-se uma freqüência alélica de 2,5% para o grupo paciente e de 2,3% para o grupo controle, resultados completamente em acordo com a freqüência do alelo em caucasóides segundo VAN DER VEM et al. (1998) que é de 2,3%.

O abortamento recorrente é considerado uma característica genética complexa e multifatorial. Muito embora o fator genético tenha se mostrado evidente em diversos estudos que sugerem a influência de alelos e variantes do gene *HLA-G* no estabelecimento da imunotolerância materna ao aloenxerto fetal, faz-se necessários estudos adicionais que confirmem resultados de associações de *HLA-G* e ARE previamente observados. É desejável inclusive que todos os resultados reportando associações negativas ou positivas sejam publicados e disponíveis para que não ocorram desvios e interpretações a favor das associações positivas. Quando num estudo-caso-controle uma associação observada se torna consistente em diferentes estudos suspeita-se que a região genômica em questão possa conter o fator genético que confere susceptibilidade e/ou proteção à doença ou fenótipo clínico investigado. Há que se considerar, no entanto que a influência de variantes alélicas de *HLA-G* na etiologia do ARE só poderá ser definitivamente confirmada quando seus efeitos funcionais puderem ser conclusivamente demonstrados.

8. CONCLUSÃO

A análise do polimorfismo genético (exons 2, 3 e 8) do gene *HLA-G* em amostras de casais com ARE e casais controles nos permitiu as seguintes conclusões:

Associações positivas ou fatores genéticos predisponentes ao ARE

- Os alelos *HLA-G*010403* e *HLA-G*010401*, o agrupamento de alelos com substituições nucleotídicas não sinônimas (*HLA-G*010401*, *G*010403*, *G*0103* e *G*0105N*) e a variante *del* (deleção de 14pb no exon 8 de *HLA-G*).

- O mesmo observou-se para os haplótipos formados entre alelos de *HLA-G* com substituição nucleotídica não sinônima e a variante *del* (exon 8) de *HLA-G*.

Associações negativas ou fatores genéticos protetores contra o ARE

- O alelo *HLA-G*010103*, o grupo *HLA-G*0101A* (*HLA-G*010101* e ou *G*010106*), de alelos agrupados com substituição nucleotídica sinônima (grupos *HLA-G*0101A* e *HLA-G*01B* e os alelos *HLA-G*010103*, *G*010107* e *G*010108*), e a variante *14* (ausência da deleção de 14pb no exon 8 de *HLA-G*).

- O mesmo observou-se entre os haplótipos formados pelo grupo *G*0101A* e a variante *14* (exon 8) e o ARE.

- Os haplótipos formados entre um alelo de *HLA-G* com substituição nucleotídica sinônima e a variante *14* (exon 8).

- Alelos do grupo *G*0101A* (*HLA-G*010101* e ou *G*010106*), e da variante *14* (exon 8) com o ARE.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A.; AGRAWAL, S.; NAIK, S.; TRIPATHI, P. Analysis of human leukocyte antigen HLA-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. **European Journal of Immunogenetics**, London, v. 31, n. 6, p. 275, 2004;

ALDRICH C. L.; STEPHENSON, M. D.; KARRISON, T.; ODEM, R. R.; BRANCH, D. W.; SCOTT, J. R.; SCHREIBER, J. R.; OBER, C. HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 7, n. 12, p. 1167-1172, 2001;

BAINBRIDGE, D.; ELLIS, S.; LE BOUTEILLER, P.; SARGENT, I. HLA-G remains a mystery. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 22, n. 10, out. 2001;

BAINBRIDGE, D.; ELLIS, S.; SARGENT, I. HLA-G supresses proliferation of CD4 (+) T-lymphocytes. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v.48, p. 17-26, 2000;

BEIGUELMAN, B. **Curso prático de bioestatística**. 5. ed. Ribeirão Preto: Editora Funpec, 2002;

BICALHO, M. G. **Variação genética de HLA-G, LTA e TNF em pacientes com abortamento recorrente**. Curitiba, 2001. 145 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná;

CAROSELLA, E. D.; ROUAS-FREISS, N.; PAUL, P.; DAUSSET, J. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 22, n. 10, out. 2001;

CAROSELLA, E. D.; DAUSSET, J.; KIRSZENBAUM, M. HLA-G revised. **Immunology Today**, Amsterdam, v.20, n.2, p.60-62, 1999;

COULAM, C. B.; STERN, J. J. Endocrine factors associated with recurrent spontaneous abortion. **Clinical Obstetrics Gynecology**, New York, v.37, p.730-744, 1994;

CASTRO M. J; MORALES, P.; ROJO-AMIGO, R.; MARTINEZ-LASO, J.; ALLENDE, L.; VARELA, P.; GARCIA-BERCIANO, M.; GUILLEN-PERALES, J.; ARNAIZ-VILLENA, A. Homozygous HLA-G*0105N healthy individuals indicate that membrane-anchored HLA-G1 molecule is not necessary for survival. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.56, p. 232-239, 2000;

CHOUDHURY, R. S.; KNAPP, L. A. Human reproductive failure I: immunogenetic and interacting factors. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 7, n. 2, pp. 135-160, 2000;

CHOUDHURY, R. S.; KNAPP, L. A. Human reproductive failure II: immunogenetic and interacting factors. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 7, n. 2, pp. 135-160, 2001;

CHRISTIANSEN, O. B.; GRUNNET, N.; LAURITSEN, J. G.; MATHIESEN, O. Idiopathic recurrent spontaneous abortion – Evidence of a familial predisposition. **ACTA Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, Gothenburg, v. 69, p. 597-601, 1990;

DUNHAN, I.; SARGENT, C. A.; TROWSDALE, J.; CAMPBELL, R.D. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulse-field gel electrophoresis. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.84, p.7235, 1987;

ELLIS, S. A.; SARGENT, I. L.; REDMAN, C. W.; MCMICHEL, A. J. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. **Immunology**, Oxford, v.59, p. 595-601, 1986;

EMMER, P. M.; VEERHOEK, M.; NELEN, W. L. D. M.; STEEGERS, E. A. P.; JOOSTEN, I. Natural killer cell reactivity and HLA-G in recurrent spontaneous abortion. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 31, p. 1838-1840, 1999;

FOURNEL, S.; AGUERRE-GIRR, M.; HUC, L.; LENFANT, F.; ALAM, A.; TOUBERT, A.; BENSUSSAN, A.; LE BOUTELLER, P. Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8⁺ Cells by interacting with CD8. **Journal of Immunology**, v164, p. 6100-6104;

FORBES, L. S. The evolutionary biology of spontaneous abortions in humans. **Trends in Ecology e Evolution**, London, v.12, p.446-450, 1997;

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A Human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmatic segment. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 84, p. 9145, 1987;

GOBIN, S. J. P.; KEIJERS, V.; CHEONG, C.; ZUTPHEN, M.; VAN DEN ELSEN, P. J. Transcriptional regulation of HLA-G. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 31, p. 1710-1716, 1999;

GOBIN, S. J. P.; VAN DEN ELSEN, P. J. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F and HLA-G. **Human Immunology**, New York, v. 61, p. 1102-1107, 2000;

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, p. 361-372, 1992;

HALL, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. *Nucleic Acids*, v.41, p. 95-98, 1999;

HIBY, S. E.; KING, A.; SHARKEY, A.; LOKE, Y. W. Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing. **Molecular Immunology**, v. 34, p. 419-430.

HUNT, J. S.; PETROFF, M. G.; MORALES, P.; SEDLMAYR, P.; GERAGHTY, D. E.; OBER, C. HLA-G in reproduction: studies on the maternal-fetal interfaces. **Human Immunology**, New York, v. 61, p. 1113-1117, 2000;

HVIID, T. V.; CHRISTIANSEN, O. B.; HYLENIUS, S.; LINDHARD A. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 64, p. 66-69, 2004(a);

HVIID, T. V. HLA-G genotype is associated with fetoplacental growth. **Human Immunology**, Shannon, v.65, p. 586-593, 2004(b);

HVIID, T. V.; CHRISTIANSEN, O. B. HOEGH, A. M.; HYLENIUS, S.; KRUSE, C. HLA-G polymorphism in couples with recurrent spontaneous abortion. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 60, p. 122-132, 2002;

HVIID, T. V.; CHRISTIANSEN, O. B. Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G – Possible implication for human reproduction and autoimmune disease. **Human Immunology**, New York, 2005;

HVIID, T. V.; MELDGAARD, M.; SORENSEN, S.; MORLING, N. Polymorphism of exon 3 of the HLA-G gene. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v. 35, p. 20-28, 1997;

ISHITANI A.; GERAGHTY D. E. Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens, **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, Washington, 1992;

JOHN, S. W. M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocyte. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 2, p. 408, 1990;

KAPASI, K.; ALBERT, S. E.; YIE, S.; ZAVAZAVA, N.; LIBRACH, C. L. HLA-G has a concentration-dependent effect on the generation of an allo-CTL response. **Immunology**, v.101, p.191-200, 2000;

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HWM DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids**, Oxford, v. 19, p. 5444, 1991;

LE BOUTEILLER, P.; LEGRAND-ABRAVANEL, F.; SOLIER, C. Soluble HLA-G1 at the materno-foetal interface – A Review. **Placenta**, Ireland, v. 17, p. S10-15, 2003;

LE BOUTEILLER, P.; BARAKONYI, A.; PIZZATO, N.; SOLIER, C. HLA-G, pre-eclampsia, immunity and vascular events. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v. 59, Issue 2, p. 219-234, 2003;

LEWIN, B. **Genes VII**. Editora Artmed: Porto Alegre, 2001;

LILA, N.; AMREIN, C.; GUILLEMAIN, R.; CHEVALIER, P.; LATREMOUILLE, C.; FABIANI, J. N.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; CARPENTIER, A. Human leukocyte antigen-G expression after heart transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. **Circulation**, Boston, v. 105, n. 16, p. 1949-1954, 2002;

LILA, N.; ROUAS-FREISS, N.; DAUSSET, J.; CARPENTIER, A.; CAROSELLA, E. D. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells supresses the allo-proliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 98, p. 12150-12155, 2001;

MCLNTIRE, H. R.; HUNT, J. S. Antigen presenting cells and HLA-G – A review. **Placenta**, Ireland, v. 26, p. S104-S109, 2005;

MORALES, P.; COREIL, A.; MARTINEZ-LASO, J.; MARTIN-VILLA, J.; VARELA, P.; PAZ-ARTAL, E.; ALLENDE, L. M.; ARNAIZ-VILLENA, A. Three new HLA-G alleles and their linkage disequilibria with HLA-A. **Immunogenetics**, New York, v. 38, p. 323-331, 1993;

MOREAU, P.; CAROSELLA, E. D.; DAUSSET, J.; MARCOU, C.; MOUILLOT, G; ROUSSEAU, P. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 100, p.1191-1196, 2003;

NOLAN, A., **Nomenclature of HLA alleles**. Disponível em: <<http://www.anthonynolan.com/HIG/lists/nomenlist.html>> Acesso em: 12 set. 2004;

OBER, C.; ALDRICH, C.; ROSINSKI, B.; ROBERTSON, A.; WALKER, M. A.; WILLADSEN, S.; VERP, M. S.; GERAGHTY, D. E.; HUNT, J. S. HLA-G1 protein expression is not essencial for fetal survival. **Placenta**, Ireland, v.19, p. 127-132, 1998;

PARHAM, P. **O sistema imune**. Editora Artmed: Porto Alegre, 2001;

PAUL, P.; CABESTRE, F. A.; IBRAHIM, E. C.; LEFEBVRE, S.; KHALIL-DAHER, I.; VAZEUX, G.; QUILES, R. M.; BERMOND, F.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. Identification of HLA-G7 as a new spliced variant of the HLA-G mRNA expression of soluble HLA-G5, -G6 and -G7 transcript in human transfected cells. **Human Immunology**, New York, v.64, n.11, p. 1138-1149, 2000;

PAZMANY, L.; MANDELBOIN, O.; VALES-GOMEZ, M.; DAVIS, D. M.; BECKER, T. C.; REYBURN, H. T.; SEEBACH, J. D.; HILL, J. A.; STROMINGER, J. L. Human leucocyte antigen-G and its recognition by natural killer cells. **Journal of Reproductive Immunology**, Shannon, v. 43, p. 127-137, 1999;

PAZMANY, L.; MANDELBOIN, O.; VALES-GOMEZ, M.; DAVIS, D. M.; REYBURN, H. I.; STROMINGER, J. L. Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. **Science**, v. 274, p. 792-795, 1996;

PÉNZES, M.; RAJCZY, K.; GYODI, E.; RETI, M.; FEHER, E.; PETRANYI, G. HLA-G gene polymorphism in the normal population and in recurrent spontaneous abortion in Hungary. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 31, n. 4, p.1832-1833, 1999;

PFEIFFER, K. A.; REBMANN, V.; PASSLER, M.; VAN DER VEN, K.; VAN DER VEN, H.; KREBS, D.; GROSSES-WILD, H. Soluble histocompatibility antigen levels in early pregnancy after IVF. **Human Immunology**, New York, v. 61, p. 559-564, 2000;

PFEIFFER, K. A.; FIMMERS, R.; ENGELS, R.; VAN DER VEN, H.; VAN DER VEN, K. The HLA-G genotype is potentially associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion, **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 7, p. 373-378, 2001;

PONTE, M.; CANTONI, C.; BIASSONI, R.; TRADORI-CAPPALÀ, A.; BENTIVOGLIO, G.; VITALE, C.; BERTONE, S.; MORETTA, A.; MORETTA, L.; MINGARI, M. C. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD49/NKG2A and acquire p49, a HLA-G1-specific receptor. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, Washington, v.96, p. 5674-5679, 1999;

REBMANN, V.; PFEIFFER, F.; PABLER, M.; FERRONE, S.; MAIER, S.; WEISS, E.; GROSSE-WILDE, H. Detection of soluble HLA-G molecules and their association to HLA-G allotypes. **Human Immunology**, New York, v. 60, p. 940-946, 1999;

ROUAS-FREISS, N.; KHALIL-DAHER, I.; GONÇALVES, R.; MENIER, C.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D. Role of HLA-G in maternal-fetal immune tolerance. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 31, p. 724-725, 1999;

ROUSSEAU, P.; MASTERNAK, K.; KRAWCZYK, M.; REITH, W.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. In vivo, RFX5 binds differently to the human leukocyte antigen-E, -F and -G promoters and participates in HLA class I protein expression in a cell type-dependent manner. **Immunology**, Oxford, v.111, n.1, p.53-65, 2004;

ROUSSEAU, P.; LE DISCORDE, M.; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. The 14bp deletion-insertion polymorphism in the 3'UTR region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability, **Human Immunology**, New York, v. 64, p. 1005-1010, 2003;

ROUSSEAU, P.; PAUL, P.; O'BRIEN, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. The X1 box of HLA-G promoter is a target site for RFX and Sp1 factors. **Human Immunology**, New York, v. 61, p. 1132-1137, 2000;

SASAKI, H.; XU, X. C.; SMITH, D.; SHENOY, S.; LOWELL, J.; HOWARD, T.; MOHANAKUMAR, T. HLA-G expression protects porcine endothelial cells against natural killer cell-mediated xenogeneic cytotoxicity. **Transplantation**, v.67, p. 31-37, 1999;

SCHNEIDER, S. **ARLEQUIN: a Software for population genetic data analysis, version 1.1**. Genetics and Biometry Laboratories, Depto. of Anthropology, University of Geneva, 1997;

TERASAKI P. I. **History of HLA** – Ten recollections. Los Angeles: UCLA, 1960;

VAN DER VEN, K.; SKRABLIN, S.; ENGELS, G.; KREBS, D. HLA-G polymorphism and allele frequencies in caucasians. **Human Immunology**, New York, v. 59, p. 302-312, 1998;

VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. HLA-G polymorphisms and molecule function – Questions and more questions – A review. **Placenta**, Orlando, v. 7, n. 4, p.373-378, 2000;

VINGANÓ, P.; CHIODO, I.; MANGIONI, S.; POMPEI, F. Maternal-conceptus cross talk – A Review. **Placenta**, Orlando, v. 00, p. 1-6, 2003;

WARBUTON, D.; FRASER, F. C. Spontaneous abortion risks in man: data from reproductive histories collected in a medical genetic unit. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.16, p.1-17, 1964;

WOOLF B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals Human Genetics**, London, v. 19, p.251-253, 1955;

YAMASHITA, T.; FUJII, T.; TOKUNAGA, K.; TADOKORO, K.; HAMAI, Y.; MIKI, A.; KOZUMA, S.; JUJI, T.; TAKETANI, Y. Analysis of human leukocyte antigen-G polymorphism including intron 4 in japanese couples with habitual abortion. **American Journal of Reproduction and Immunology**, Rhode Island, v.41, p. 159-163, 1999.

APÊNDICE 1

FICHA DE AVERIGUAÇÃO CASAL-PACIENTE

Laboratório de Imunogenética. Departamento de Genética – UFPR

PROJETO: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CASAL PACIENTE

CASAL FER –

1 – Identificação do Casal

1 - Nome da mulher			
2 - Data de Nasc.	Idade	G. Étnico	
3 – Profissão		G. Sanguíneo	
4 – Nome do Marido			
5 – Data de Nasc.	Idade	G. Étnico	
6 – Profissão		G. Sanguíneo	
7 – Endereço:		Nº	
Apartamento	Bairro	Cidade	Estado
CEP	Tel. Res.	Tel. Com.	

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união		Consangüinidade: S	N
2 – Idade da mulher ao se casar		Grau de parentesco:	
3 – Nº total de concepções:	Abortos:	Natimortos:	N. vivos:
4 – Concepções: 1ª	2ª	3ª	4ª
6ª			5ª
5 – Outras uniões ou casamentos:		Consangüinidade: S	N
6 – Data da união:		Nº de concepções:	
7 – Idade da mulher ao se casar			

3 – Antecedentes Maternos

1 – Concebe facilmente		
2 – Usa método anticoncepcional?	Há quanto tempo?	Qual?
3 – Idade da primeira menstruação		
4 – Enfermidade aguda? Especifique:		
5 – Enfermidade crônica?		
6 – Doença auto-imune?		
7 – Recebeu transfusão sanguínea?	Quando?	

APÊNDICE 2

FICHA DE AVERIGUAÇÃO CASAL-PACIENTE - VERSO

Laboratório de Imunogenética. Departamento de Genética – UFPR

4 – Resumo da História Clínica

- 1 – Nome do médico
- 2 – Histórico

5 – Heredograma

6 – Outros fatores

- 1 – Fatores femininos
 - a) Problemas ovulatórios com Clamídias
 - b) Cervix incompetente
 - c) Síndrome de Asherman
 - d) Endometriose
 - e) Efeito da fase luteal
- 2 – Fatores masculinos
 - a) Prostatite
- 3 – Fatores do Casal
 - a) Infecção por Micoplasma

APÊNDICE 3

FICHA DE AVERIGUAÇÃO CASAL-CONTROLE

Laboratório de Imunogenética. Departamento de Genética – UFPR

PROJETO: Estudos genéticos sobre HLA e Fertilidade

CASAL CONTROLE

CASAL FER –

1 – Identificação do Casal

1 - Nome da mulher				
2 - Data de Nasc.	Idade		G. Étnico	
3 – Profissão			G. Sanguíneo	
4 – Nome do Marido				
5 – Data de Nasc.	Idade		G. Étnico	
6 – Profissão			G. Sanguíneo	
7 – Endereço:			Nº	
Apartamento	Bairro	Cidade		Estado
CEP	Tel. Res.	Tel. Com.		

2 – Dados do Casal Atual

1 – Data de união		Consangüinidade: S	N
2 – Idade da mulher ao se casar		Grau de parentesco:	
3 – Nº total de concepções:	Abortos:	Natimortos:	N. vivos:
4 – Concepções: 1ª	2ª	3ª	4ª
6ª			5ª
5 – Outras uniões ou casamentos:		Consangüinidade: S	N
6 – Data da união:		Nº de concepções:	
7 – Idade da mulher ao se casar			

3 – Antecedentes Maternos

1 – Concebe facilmente		
2 – Usa método anticoncepcional?	Há quanto tempo?	Qual?
3 – Idade da primeira menstruação		
4 – Enfermidade aguda? Especifique:		
5 – Enfermidade crônica?		
6 – Doença auto-imune?		
7 – Recebeu transfusão sanguínea?	Quando?	

APÊNDICE 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) Você está sendo convidado a participar como: () PACIENTE () CONTROLE de um estudo intitulado “DETECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO PROGNÓSTICO E ACEITAÇÃO DO ALO-ENXERTO E ENXERTO SEMI-ALOGÊNICO”. É através das pesquisas, inclusive básicas, que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância;

b) O objetivo desta pesquisa é tentar contribuir para que órgãos transplantados como o rim sejam melhor aceitos pelo receptor bem como contribuir para tentar esclarecer fenômenos relacionados aos abortos recorrentes de causas desconhecidas. E a participação de controles neste caso é de fundamental importância, pois através das comparações entre transplantes bem aceitos ou não é que poderemos chegar a fatos importantes, assim como entre aqueles casais com abortos de repetição e aqueles casais com dois ou mais filhos;

c) Caso você participe da pesquisa, será necessário que você forneça uma amostra de sangue (10ml);

d) O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam danos a pacientes ou controles;

e) Não há riscos para você;

f) Para tanto você deverá comparecer ao LIGH, para coleta de sangue;

g) A pesquisadora responsável pelo projeto, Profa. Maria da Graça Bicalho – fone: 361-1729 poderá ser contatada no LIGH;

h) Está garantido que você terá todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa;

i) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar da pesquisa;

j) As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório, publicação ou por qualquer meio, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida;

l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são de responsabilidade dos pacientes ou controles;

m) Pela sua participação na pesquisa você não receberá qualquer valor em dinheiro;

n) Quando os resultados forem divulgados, não aparecerá seu nome e sim um código;

Eu, li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa para a qual fui convocado a participar. A explicação que recebi menciona o fato relacionado a coleta de sangue e seus inconvenientes. Eu entendi que sou livre para interromper ou não participar da pesquisa.

Eu concordo, voluntariamente, em participar desta pesquisa.

Ass. Do Paciente/Controle

Ass. Pesquisador

Data